

# Charakterisierung von Wnt, MAPK und FGF Signalwegen während der Migration naszierender Myotuben auf die Testes von *Drosophila*



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Silke Fender  
aus Germersheim  
Marburg/Lahn, 2016

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am: 29. November 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am: 12. Dezember 2016



## Inhalt

<b>1. Summary</b>	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>3</b>
3.1 Zellmigrationsprozesse sind essentiell in der Entwicklung von mehrzelligen Organismen, in deren Physiologie und Regeneration, aber auch in der Entstehung von Krankheiten involviert . . . . .	3
3.2 In <i>Drosophila</i> sind Zellmigrationsprozesse wie die „border cell“ Migration gut untersucht. . . . .	3
3.3 Entwicklung des männlichen Reproduktionstraktes von <i>Drosophila</i> . . . . .	4
3.3.1 Die Entwicklung der Reproduktionsorgane beginnt im Embryo . . . . .	4
3.3.2 Während der Metamorphose wachsen die Genitalscheibe und pupale Testes aufeinander zu . . . . .	5
3.3.3 Das adulte männliche Reproduktionssystem von <i>Drosophila</i> . . . . .	6
3.3.4 Die Testismuskulatur entsteht durch Fusion und eine davon unabhängige Migration . . . . .	7
3.3.5 Migration der naszierenden Testes-Myotuben während der Metamorphose . . . . .	8
3.4 Wnt Signalwege sind evolutionär konserviert . . . . .	10
3.4.1 Der kanonische Wnt Signalweg . . . . .	10
3.4.2 Der kanonische Wnt Signalweg ist in verschiedene Zellmigrationsprozesse involviert. . . . .	11
3.4.3 Nichtkanonische Wnt Signalwege. . . . .	12
3.4.3.1 Das globale PCP Modul. . . . .	12
3.4.3.2 Das PCP Kernmodul . . . . .	13
3.4.4 Das PCP Kernmodul ist essentiell für viele Zellmigrationen. . . . .	14
3.5 MAPK Signalwege sind evolutionär stark konserviert . . . . .	15
3.5.1 MAPK Signalwege können verschiedene Zellmigrationsprozesse beeinflussen . . . . .	16
3.5.2 Die MAPK KKKK Misshapen ist in <i>Drosophila</i> an Zellmigrationsprozessen beteiligt. . . . .	17
3.6 FGF Signalwege sind essentiell in multizellulären Organismen . . . . .	18
3.6.1 FGF Signalwege in <i>Drosophila</i> . . . . .	19
3.6.2 FGF Signalwege sind an vielen Migrationsprozessen in <i>Drosophila</i> beteiligt . . . . .	20
3.7 Zielsetzung . . . . .	22

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1 Das Expressionsmuster der <i>frizzled2</i> -GFP Enhancertrap Linie weist auf den Wnt Signalweg als Regulator der Migration naszierender Testes-Myotuben hin . . . . .	23
4.2 Die Suche nach neuen Gal4-Treiberlinien, die für die Migration geeignet sind, ist noch nicht abgeschlossen . . . . .	25
4.3 Untersuchungen des kanonischen Wnt Signalweges bezüglich einer möglichen Steuerung der Migration von Testes-Myotuben . . . . .	25
4.3.1 Wnt Komponenten werden in Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert . . . . .	26
4.3.2 Bekannte Zielgene des kanonischen Wnt Signalweges werden in Myoblasten transkribiert . . . . .	27
4.3.3 Ein Frizzled2-abhängiger kanonischer Wnt Signalweg könnte in naszierenden Testes-Myotuben aktiv sein . . . . .	29
4.3.4 Muskelspezifische Herunterregulation von <i>frizzled2</i> und <i>armadillo</i> beschädigt die Testismuskulatur . . . . .	31
4.3.5 Pangolin beeinflusst die Fusion Testes-relevanter Myoblasten . . . . .	34
4.3.6 DWnt2 steuert die Determination der Testismuskeln . . . . .	37
4.4 Analysen der nicht-kanonischen Wnt Signalwege hinsichtlich einer Beteiligung an der Migration von Testes-Myotuben . . . . .	41
4.4.1 Transkripte der Komponenten beider PCP Signalwege sind in Testes-relevanten Myoblasten detektierbar. . . . .	41
4.4.2 Das PCP Kernmodul ist vermutlich nicht an der Migration der Testes-Myotuben beteiligt. . . . .	42
4.5 Analyse der Focal adhesion kinase bezüglich einer Relevanz in der Migration von Testes-Myotuben . . . . .	44
4.5.1 Die Kinase Fak ist in naszierenden Testes-Myotuben transkribiert. . . . .	44
4.5.2 Die Reduktion von <i>Fak</i> in der Testishülle stört nicht die Migration von Testes-Myotuben . . . . .	46
4.6 Untersuchungen des MAP Kinase-Weges bezüglich der Migration von Testes-Myotuben . . . . .	47
4.6.1 Der MAP Kinase-Weg ist in naszierenden Testes-Myotuben während der Migration aktiviert . . . . .	47
4.6.2 Die MAPKKKK Misshapen ist essentiell für die korrekte Migration der Testes-Myotuben . . . . .	48
4.7 Analysen des FGF Signalweges hinsichtlich einer Relevanz in der Migration von Testes-Myotuben . . . . .	51
4.7.1 Der FGF Signalweg ist während der Migration von Testes-Myotuben aktiviert . . . . .	51
4.7.2 Die Heartless-abhängige FGF Signalkette ist wesentlich für die Migration naszierender Myotuben . . . . .	52

4.7.3	Ein Breathless-abhängiger FGF Signalweg beeinflusst die Fusion Testes-relevanter Myoblasten . . . . .	56
4.8	In <i>ex vivo</i> Co-Kulturen aus Genitalscheiben und Testes kann die Migration naszierender Testes-Myotuben verfolgt werden . . . . .	57
4.8.1	Stumps wird für die Migration naszierender Myotuben auf dem Testis benötigt . . . . .	58
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
5.1	GFP-Enhancertraps sind nur bedingt einsetzbar, um die Migration naszierender Myotuben zu untersuchen. . . . .	60
5.2	Es muss weiter nach geeigneten Treiberlinien für die Migration naszierender Testes-Myotuben gesucht werden . . . . .	60
5.3	Der kanonische Wnt Signalweg ist an Zellmigrationsprozessen beteiligt. . .	61
5.3.1	Die Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges werden vermutlich in Testes-relevanten Myoblasten transkribiert . . . . .	61
5.3.2	Der kanonische Wnt Signalweg wird in Testes-relevanten Myoblasten oder Testes-Myotuben aktiviert . . . . .	62
5.3.3	Über Frizzled2 könnte der kanonische Wnt Signalweg in Testes-relevanten Myoblasten aktiviert werden . . . . .	62
5.3.4	Frizzled2, Armadillo sowie Shaggy tragen zur Entwicklung der Testismuskulatur bei . . . . .	63
5.3.5	Ein Frizzled2-abhängiger kanonischer Wnt Signalweg könnte die Fusion Testes-relevanter Myoblasten induzieren . . . . .	65
5.3.6	DWnt2 reguliert vermutlich die Determination der Testes-relevanten Myoblasten . . . . .	65
5.3.7	Einordnung der Ergebnisse zum kanonischen Wnt Signalweg. . . . .	66
5.4	Nicht-kanonische Wnt Signalwege können die Migration von Zellen beeinflussen . . . . .	67
5.4.1	Das PCP Kernmodul reguliert möglicherweise die Zellpolarität der Testismuskeln . . . . .	67
5.5	MAP Kinasen regulieren die Migration verschiedener Zellen . . . . .	68
5.5.1	Die MAP Kinase Erk ist in naszierenden Myotuben vor sowie nach der Migration auf den Testis aktiviert . . . . .	68
5.5.2	Misshapen reguliert die Migration der Testes-Myotuben sowie die Anordnung der F-Aktin Filamente in Testismuskeln . . . . .	69
5.5.3	Misshapen scheint die Expression von Cadherin-N nicht direkt zu beeinflussen . . . . .	70
5.6	FGF Signalwege regulieren die Entwicklung der Reproduktionsorgane in <i>Drosophila</i> . . . . .	70
5.6.1	Stumps könnte die MAPK Erk in naszierenden Testes-Myotuben ansteuern . . . . .	71
5.6.2	Heartless wird benötigt, um den Testis mit Muskeln zu besiedeln . . .	71

5.6.3	Stumps ist essentiell für die Migration der Testes-Myotuben in Richtung Testisspitze . . . . .	73
5.6.4	Breathless könnte zur Induktion der Fusion von Testes-relevanten Myoblasten beitragen . . . . .	74
5.6.5	Einordnung der Ergebnisse zum FGF Signalweg . . . . .	74
5.7	Es konnten erfolgreich <i>ex vivo</i> Co-Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes etabliert werden. . . . .	75
5.7.1	Kulturen von Genitalscheiben können deren Entwicklung zeigen. . . . .	75
5.7.2	Stumps ist essentiell für die Migration der naszierenden Myotuben in Richtung Testisspitze . . . . .	76
5.8	Zusammenfassendes Modell. . . . .	76
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Material</b>	<b>81</b>
7.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	81
7.2	Verwendete Geräte . . . . .	81
7.2.1	Mikroskope . . . . .	81
7.2.2	Weitere Geräte . . . . .	81
7.3	Antibiotika . . . . .	81
7.4	Enzyme . . . . .	82
7.5	Kits und Sonstiges. . . . .	82
7.6	Puffer und Lösungen . . . . .	82
7.7	Nähr- und Kulturmedien für <i>Drosophila</i> und <i>Escherichia coli</i> . . . . .	83
7.8	Bakterienstämme . . . . .	83
7.9	Verwendete cDNAs . . . . .	83
7.10	Vektoren. . . . .	84
7.11	Oligonukleotide. . . . .	84
7.11.1	Sequenzierungsprimer . . . . .	84
7.11.2	Primer zur Sondenherstellung . . . . .	84
7.11.3	Kontrollprimer für RT-PCR . . . . .	84
7.11.4	Primer für RT-PCR . . . . .	84
7.12	Verwendete Antikörper und Marker. . . . .	86
7.12.1	Primäre Antikörper. . . . .	86
7.12.2	Sekundäre Antikörper . . . . .	86
7.12.3	Fluoreszenz-gekoppelte Marker . . . . .	86
7.13	Verwendete Seren . . . . .	87
7.14	<i>Drosophila</i> -Stämme . . . . .	87
7.14.1	Allgemeine Fliegenlinien . . . . .	87

7.14.2 RNAi-Fliegenlinien . . . . .	87
7.14.3 Gal4-Treiberlinien . . . . .	88
7.14.4 Mutanten . . . . .	88
7.14.5 UAS-Effektorstämme . . . . .	89
7.14.6 Reporterlinien . . . . .	89
7.15 Verwendete Software und Internetseiten. . . . .	90
<b>8. Methoden</b>	<b>91</b>
8.1 Histologische Methoden. . . . .	91
8.1.1 Präparation von Genitalscheiben und pupalen Testes . . . . .	91
8.1.2 Präparation adulter Reproduktionssysteme . . . . .	91
8.1.3 Immunfluoreszenz an Genitalscheiben, pupalen Testes sowie adulten Reproduktionssystemen . . . . .	91
8.1.4 Cytoskelett- und Kernfärbungen an adulten Reproduktionssystemen .	92
8.1.5 Live imaging von <i>ex vivo</i> Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes . . . . .	92
8.1.6 <i>in situ</i> Hybridisierung an Genitalscheiben und pupalen Testes . . . .	92
8.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	94
8.2.1 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden . . . . .	94
8.2.2 Spot-Test DIG-markierter RNA-Sonden . . . . .	94
8.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	95
8.2.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten . . . . .	96
8.2.5 Ligation von PCR-Produkten mithilfe des TOPO <sup>®</sup> Cloning Kits . . . .	96
8.2.6 Transformation chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ Zellen. . . . .	96
8.2.6.1 Transformation eines Ligationsansatzes . . . . .	96
8.2.6.2 Transformation von cDNAs . . . . .	96
8.2.7 Plasmidaufreinigung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation) . .	97
8.2.8 Plasmidaufreinigung in präparativem Maßstab (Midi-Präparation) . .	97
8.2.9 Plasmid-Restriktion mithilfe von Endonukleasen . . . . .	98
8.2.10 Isolierung mCD8-GFP-positiver Myoblasten aus Genitalscheiben . .	98
8.2.11 Gesamt-RNA Isolation aus Myoblasten . . . . .	99
8.2.12 Gesamt-RNA Isolation aus pupalen Testes . . . . .	99
8.2.13 mRNA Isolation aus Myoblasten-Gesamt-RNA . . . . .	100
8.2.14 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). . . .	100
8.3 Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	101
8.3.1 Stammhaltung und Zucht. . . . .	101
8.3.2 Ansetzen von Kreuzungen. . . . .	101

---

8.3.3 Kreuzungsgenetik von RNAi-Kreuzungen. . . . .	101
8.3.4 Kernzählungen bei RNAi-Kreuzungen . . . . .	102
8.3.5 Fertilitätstests von RNAi-Kreuzungen. . . . .	102
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>119</b>
10.1 Abkürzungsverzeichnis . . . . .	119
10.2 GFP-Trap Linien . . . . .	121
10.3 Gal4-Treiber. . . . .	125
10.4 Kanonischer Wnt Signalweg. . . . .	128
10.5 Nicht-kanonische Wnt Signalwege . . . . .	134
10.6 Focal adhesion kinase . . . . .	135
10.7 MAP Kinase-Weg . . . . .	135
10.8 FGF Signalweg . . . . .	136
10.9 <i>Ex vivo</i> Kulturen. . . . .	140
<b>11. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>12. Tabellenverzeichnis</b>	<b>144</b>
<b>13. Erklärung</b>	<b>145</b>

## 1. Summary

The adult male reproductive system of *Drosophila* comprises paired testes, seminal vesicles, paragonia as well as a single ejaculatory duct and the sperm pump. All organs except the testes are surrounded by muscle layers, which consist of mono- or multinucleated striated muscles. In contrast, testes are surrounded by multinucleated, smooth-like muscles (Susic-Jung et al., 2012). These muscles originate from the genital imaginal disc, where 28 hours after puparium formation testes-relevant myoblasts start to fuse on the prospective seminal vesicles. The resulting nascent myotubes then migrate onto the pupal testes and migrate further towards the apical testis tip (Kuckwa et al., 2016). The aim of the present study was to search for proteins and signaling pathways which regulate the migration.

Canonical Wnt signaling is involved in the development of the testis musculature; the determination of testes-relevant myoblasts on the genital disc is DWnt2-dependent. RNAi-mediated knock-down of *armadillo* (*beta-Catenin*) results in two defects: i) the testes are too small and not fully coiled and ii) the muscles are not connected, presumably due to a reduced number of myotubes reaching the testis. This indicates a role of Wnt signaling during migration and a Wnt-independent role of Armadillo in connecting the testis muscles to build a tight sheath through interactions with Cadherins.

The kinase Misshapen and respective signaling pathways regulate the migration of nascent testes myotubes towards the testis tip as well as the arrangement of F-actin filaments in testis muscles. Analyses concerning FGF signaling revealed that the FGF receptor Heartless, but not Breathless, as well as the adaptor protein Stumps are required to cover the testis completely with muscles. In the absence of Stumps, some nascent myotubes can reach the testes but fail to migrate towards the apical testis tip.

If the testis musculature is partly or completely absent, the testis remains in its larval shape and exhibits abnormal morphology with uncomplete coiling of the testis tubule.

Genetic approaches in combination with *ex vivo* cultures and live imaging implicate that the migration of testes myotubes can be divided into two phases: during phase one, nascent myotubes migrate collectively onto the testis, phase two shows the migration of single testes myotubes towards the testis tip.

## 2. Zusammenfassung

Das adulte männliche Reproduktionssystem von *Drosophila* besteht aus paarig vorliegenden Testes, Seminal Vesicles und Paragonien sowie einem einzelnen Ductus ejaculatus und der Spermienpumpe. Die Organe sind von Muskelschichten umgeben, die mit Ausnahme der Testismuskulatur ein- oder mehrkernige gestreifte Muskeln beinhalten. Die Testes sind von glatten, mehrkernigen Muskeln umgeben (Susic-Jung et al., 2012). Diese Muskeln entstehen etwa ab 28 Stunden nach der Verpuppung durch die Fusion Testes-relevanter Myoblasten auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles der Genitalimaginalscheibe. Die resultierenden naszierenden Myotuben wandern daraufhin auf die pupalen Testes und weiter in Richtung Testisspitze (Kuckwa et al., 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach Proteinen und Signalwegen gesucht, die die Migration regulieren.

An der Entwicklung der Testismuskulatur ist der kanonischen Wnt Signalweg beteiligt. Die Determination der Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe ist abhängig von DWnt2. Ein RNAi-vermittelter knock-down von *armadillo* (*beta-Catenin*) zeigt zwei Defekte: die Testes sind zu klein und nicht vollständig aufgerollt, zudem sind die Muskeln nicht miteinander verbunden, vermutlich weil zu wenige Myotuben auf den Testis gelangen. Dies deutet auf eine Rolle des Wnt Signalweges während der Migration und eine Wnt-unabhängige Rolle von Armadillo bei der Verknüpfung der Testismuskeln zu einer dichten Schicht über Cadherin-Catenin Verbindungen hin.

Die Kinase Misshapen, und somit entsprechende Signalwege, ist sowohl für die Migration der Testes-Myotuben in Richtung Testisspitze als auch die Anordnung der F-Aktin Filamente in den Muskeln notwendig. Analysen der FGF Signalwege machten deutlich, dass der Rezeptor Heartless, jedoch nicht Breathless, sowie das Adapterprotein Stumps benötigt werden, um den Testis vollständig mit Muskeln zu bedecken. In Abwesenheit von Stumps können zwar einige naszierende Myotuben auf die Testes gelangen, jedoch nicht in Richtung Testisspitze wandern.

Fehlt die Muskulatur ganz oder weitgehend, verbleibt der Testis in larvaler Form bzw. zeigt eine abnormale Morphologie in Form von unvollständiger Windung.

Genetische Experimente in Kombination mit *ex vivo* Kulturen und „live imaging“ implizieren, dass die Migration der Testes-Myotuben in zwei Phasen unterteilt werden kann: in der ersten Phase wandern die naszierenden Myotuben im Verbund auf den Testis, Phase zwei beinhaltet die Migration der einzelnen Myotuben in Richtung Testisspitze.



### 3. Einleitung

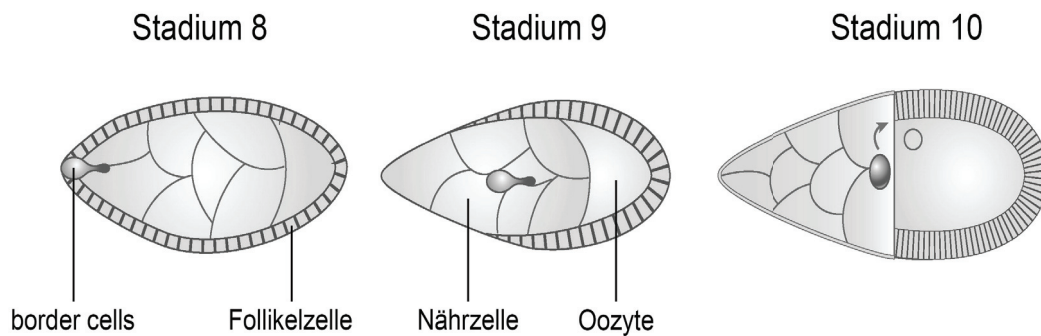
#### 3.1 Zellmigrationsprozesse sind essentiell in der Entwicklung von mehrzelligen Organismen, in deren Physiologie und Regeneration, aber auch in der Entstehung von Krankheiten involviert

Die Zellmigration ist ein bedeutender Prozess in der Entwicklung eines Organismus. Beginnend bei der Invagination des Mesoderms während der Gastrulation über die Bildung der Organe bis hin zum Wandern der Zellen des Immunsystems und der Wundheilung ist die Migration von Zellen essentiell für die Etablierung und den Erhalt eines adulten und gesunden Organismus (Reig et al., 2014; Shaw und Martin, 2016). Aber auch viele Krankheitsbilder wie Krebs werden durch migrierende Zellen verursacht, wobei Tumorzellen alle bisher beschriebenen Migrationsformen zeigen können (Roussos et al., 2011). Prinzipiell wird die Migration einzelner Zellen von der kollektiven Zellmigration im Verbund unterschieden sowie gerichtete von nicht-gerichteter Migration (Reig et al., 2014). Ein Beispiel für die gerichtete chemotaktische Migration einzelner Zellen sind die Vorläufer der Keimzellen (primordial germ cells, PGCs) im Zebrafisch Embryo (Boldajipour et al., 2008). Neuralleistenzellen in Embryonen von *Xenopus laevis* reagieren ebenfalls gerichtet auf ein chemotaktisches Signal, migrieren dabei jedoch als Kollektiv (Maj et al., 2016; Pegoraro und Monsoro-Burq, 2013; Theveneau et al., 2010). *Drosophila melanogaster* ist aufgrund der genetischen Zugänglichkeit sowie der kurzen Generationszeit ein häufig genutzter Modellorganismus für Zellmigrationsprozesse in der Entwicklung sowie Entstehung von Krankheiten (Pocha und Montell, 2014).

#### 3.2 In *Drosophila* sind Zellmigrationsprozesse wie die „border cell“ Migration gut untersucht

In Ovarien von *Drosophila* ist die Migration der sogenannten „border cells“ ein effektives und zugängliches *in vivo* Modell zur Invasion von Zellen in umgebende Gewebe (Montell, 2003; Montell et al., 2012; Pocha und Montell, 2014). Die Oogenese von *Drosophila* findet in einem Einährverband statt, der aus Keimzelle, Nährzellen und Follikelzellen besteht. Dieser Verband entsteht in den frühen Stadien der Oogenese. In Stadium 8 umgeben die „border cells“ zwei basal gelegene Zellen und umschließen diese (Abb. 1). Die gerichtete Migration in Richtung apikal gelegener Oozyte beginnt im Stadium 9, die Zellen migrieren dann kollektiv im Zellverbund zwischen den Nährzellen hindurch. Hierbei reagieren sie auf Ecdyson und Unpaired, den Liganden des JAK/STAT Signalweges. In Stadium 10 gelangt der „border cell“ Verbund zu der apikal im Follikel gelegenen Oozyte. Die Zellen des Verbundes produzieren im weiteren Verlauf der Oogenese die Mikropyle, die spezifische Struktur in der

Eihülle, durch die das Spermium eintritt (Montell et al., 2012; Pocha und Montell, 2014).



**Abbildung 1: Überblick der „border cell“ Migration in Ovarien von *Drosophila*.** In Stadium 8 bildet sich das „border cell“ Cluster, darauf beginnt die kollektive Migration in Richtung apikal gelegener Oozyte. In Stadium 10 erreicht der Zellverbund die Oozyte (modifiziert nach Pocha und Montell, 2014).

Weitere gut analysierte Migrationsprozesse in *Drosophila* sind die Gastrulation, die Migration der PGCs sowie der Hämocyten genannten Immunzellen und der Dorsalschluss in der Embryonalentwicklung (Pocha und Montell, 2014). Alle diese Prozesse mit Ausnahme des Dorsalschlusses beinhalten die Migration einzelner Zellen.

### 3.3 Entwicklung des männlichen Reproduktionstraktes von *Drosophila*

#### 3.3.1 Die Entwicklung der Reproduktionsorgane beginnt im Embryo

Die Entwicklung der adulten Reproduktionssysteme von *Drosophila* beginnt bereits im Embryo mit der Migration der PGCs vom Ort der Entstehung durch das Epithel der dorsalen Endoderm-Anlage zur späteren Gonade. Dieser auch als Polzellmigration bekannte Prozess wurde intensiv untersucht, da das invasive Migrationsverhalten der PGCs an metastasierende Krebs Zellen erinnert (Pocha und Montell, 2014; Starz-Gaiano und Lehmann, 2001). Die Polzellen werden bereits 1,5 Stunden nach der Eiablage am posterior gelegenen Pol des *Drosophila* Embryos gebildet und adhären an somatischen Zellen, aus denen ein Teil des Mitteldarms entstehen wird (Sonnenblick, 1941). Dann wandern die Polzellen mit dem Auswachsen des Keimstreifens während der Gastrulation in den Mitteldarm eingeschlossen in den Embryo und durchqueren das Epithel des Mitteldarms, um freizukommen (Jaglarz und Howard, 1995). Nach dem Durchqueren des Darmepithels migrieren die Polzellen ins Mesoderm, wo sie sich in Richtung der somatischen Gonaden-Vorläuferzellen bewegen (Boyle und DiNardo, 1995). Zusammen entwickeln sich in Stadium 14 die beiden Zelltypen zu den embryonalen Gonaden (Moore et al., 1998).

Der sexuelle Dimorphismus, also die Unterscheidung in weibliche und männliche Gonaden, wird unter anderem durch *Sox100B* bestimmt (DeFalco et al., 2003; Nanda et al.,

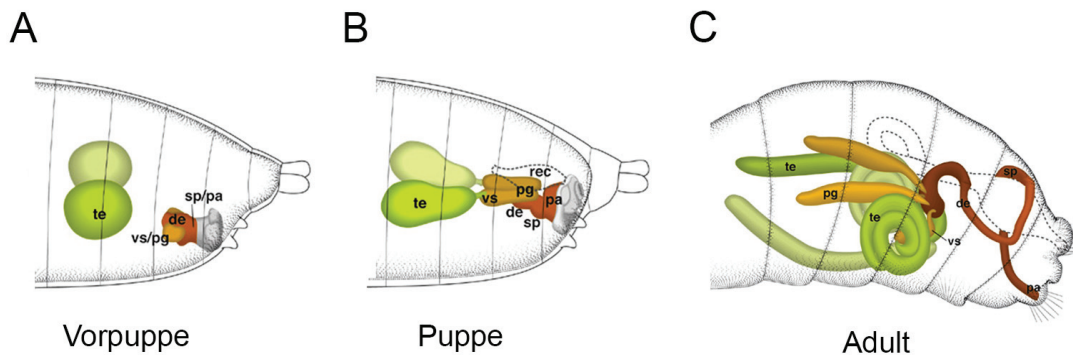
2009), das *Drosophila* Ortholog von Gruppe E Sox Genen aus Vertebraten, die zur Determination der Geschlechter beitragen (Hui Yong Loh und Russell, 2000). *Sox100B* wird spezifisch in den somatischen Vorläuferzellen des Testis exprimiert sowie in den Pigmentzellen, die den Testis umgeben (DeFalco et al., 2003; DeFalco et al., 2008). Mutationen von *Sox100B* stören dementsprechend die Entwicklung der Testes (Nanda et al., 2009). Der sexuelle Dimorphismus wird außerdem durch das Wnt Protein DWnt2 (Kozopas et al., 1998) sowie FGF (fibroblast growth factor) Signalketten beeinflusst (Ahmad und Baker, 2002).

### 3.3.2 Während der Metamorphose wachsen die Genitalscheibe und pupale Testes aufeinander zu

Zusätzlich zu den paarigen Gonaden entwickelt sich bereits im Embryo aus Teilen der abdominalen Segmente A8, A9 und A10 die Genitalimaginalscheibe (Genitalscheibe). Die Genitalscheibe ist die einzige Imaginalscheibe in *Drosophila*, die sich zwischen den Geschlechtern unterscheidet und nicht paarig angelegt ist, sondern mittig im Tier liegt (Estrada et al., 2003). Dennoch durchlaufen die Zellen der Genitalscheibe in der Larve genauso wie die der anderen Imaginalscheiben Proliferationen und differenzieren sich nach der Verpuppung. Aus der somatisch angelegten Genitalscheibe und den paarigen Gonaden entwickelt sich während der Metamorphose das Reproduktionssystem (Estrada et al., 2003; Stern, 1941).

Das männliche Reproduktionssystem besteht im adulten Tier aus fünf verschiedenen Organen, den jeweils paarig angelegten Testes, Seminal Vesicles und Paragonien, sowie einem einzelnen Ductus ejaculatus und einer Spermiumpumpe. Hierbei gehen die Testes aus den embryonalen Gonaden hervor und die anderen Organe entwickeln sich aus der Genitalscheibe (Estrada et al., 2003; Stern, 1941; Susic-Jung et al., 2012).

Zu Beginn der Metamorphose liegen die noch runden Gonaden im abdominalen Segment A5 und die Genitalscheibe einige Segmente entfernt (Abb. 2A) (Estrada et al., 2003; Greig und Akam, 1995; Stern, 1941). Im Verlauf der Metamorphose wachsen beide Strukturen aufeinander zu, bis die sich entwickelnden Seminal Vesicles mit dem terminalen Epithel der Testes verschmelzen (Abb. 2B) (Kozopas et al., 1998; Nanda et al., 2009; Stern, 1941). Außerdem wandern Muskeln von den sich entwickelnden Seminal Vesicles auf die pupalen Testes (Abb. 4) (Kozopas et al., 1998). Anschließend wachsen die Testes sowie die Genitalscheibe stark an und die somatischen Organe des Reproduktionssystems entwickeln sich (Abb. 2C) (Chen und Baker, 1997; Kozopas et al., 1998; Stern, 1941; Susic-Jung et al., 2012).



**Abbildung 2: Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane während der Metamorphose.** Direkt nach der Verpuppung liegen die Testes (te) und die Genitalscheibe noch einige Segmente auseinander (A). Im Zuge der Metamorphose wachsen die Testes und die Genitalscheibe aufeinander zu und verschmelzen. Die somatischen Organe beginnen sich zu differenzieren (B). Im adulten Tier sind die Reproduktionsorgane vollständig ausgebildet (C). vs = Seminal Vesicles; pg = Paragonien; de = Ductus ejaculatus; sp = Spermienpumpe; pa = Penis apparatus (modifiziert nach Hartenstein, 1993).

### 3.3.3 Das adulte männliche Reproduktionssystem von *Drosophila*

Die adulten Testes von *Drosophila* sind zwei lange, dünne Schläuche, die 2,5 Umdrehungen aufweisen (Stern, 1941). In den Testes entwickeln sich die männlichen Keimzellen von der apikalen Testisspitze, Hubregion genannt, in Richtung proximales Ende (Fuller, 1993).

Ein Testisschlauch von *Drosophila* ähnelt einem einzelnen Samenkanälchen (seminiferous tubule) aus einem Säuger-Testis. Samenkanälchen sind von peritubulären Zellen umgeben, die Marker von glatten Muskeln exprimieren und für den Spermientransport benötigt werden (Welter et al., 2013). Vergleichbar dazu sind *Drosophila* Testes von einer Schicht aus glatt erscheinenden Muskeln umgeben, die jedoch im Gegensatz zu Vertebraten multinukleär sind. Auch die anderen Reproduktionsorgane beinhalten Muskelschichten, diese bestehen allerdings aus gestreiften Muskeln. Die Muskeln der Seminal Vesicles sowie der Spermienpumpe sind hierbei multinukleär, wohingegen die Muskelschichten, die die Paragonien und den Ductus ejaculatus umgeben, mononukleär sind (Susic-Jung et al., 2012).

Das Vorhandensein multinukleärer Muskeln in männlichen Reproduktionsorganen steht im Gegensatz zu der Muskulatur des weiblichen Reproduktionssystems. In den Ovarien von *Drosophila* sind drei verschiedene Muskeltypen zu finden, die jedoch alle gestreift sowie mononukleär sind (Hudson et al., 2008; Middleton et al., 2006). Die Testismuskulatur ist die einzige bisher beschriebene glatte Muskulatur mit mehreren Zellkernen pro Muskel in *Drosophila* (Susic-Jung et al., 2012).

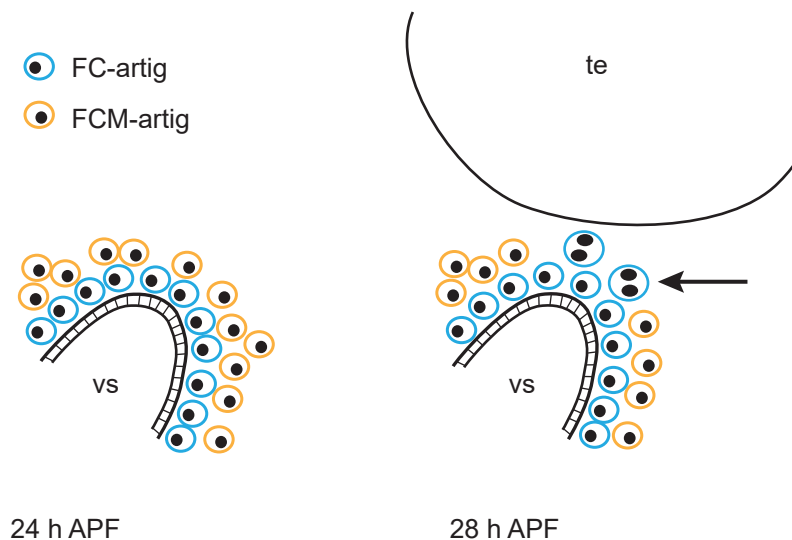
### 3.3.4 Die Testismuskulatur entsteht durch Fusion und eine davon unabhängige Migration

Die Entstehung dieser multinukleären glatten Testismuskulatur ist bisher nur teilweise untersucht. Mehrkernigkeit von Zellen kann durch Zellfusionen oder Zellkernteilungen ohne anschließende Cytokinese zustande kommen, wie beispielsweise während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* (Foe et al., 1993). Die Mehrkernigkeit der Testismuskeln von *Drosophila* entsteht jedoch nicht durch einen Ausfall der Cytokinese. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) auf der Genitalscheibe exprimiert werden, und zwar genau in den Myoblasten, die später die Testismuskulatur bilden werden, den sogenannten Testes-relevanten Myoblasten (Kuckwa et al., 2016).

Die IgSF-Moleküle Dumbfounded (Duf), Roughest (Rst), Hibris (Hbs) und Sticks and Stones (Sns) sind aus der gut untersuchten Myoblastenfusion im Embryo bekannt. Zur Bildung der somatischen Muskulatur fusionieren dort zwei verschiedene Myoblastenarten miteinander, die Founder Zellen (founder cells, FCs) mit den Fusionskompetenten Myoblasten (fusion competent myoblasts, FCMs). Der heterotypischen Fusion geht eine Erkennung und Adhäsion vorher, die durch IgSF-Moleküle vermittelt wird. Duf wird spezifisch auf der Oberfläche von FCs exprimiert und interagiert mit Sns, das spezifisch auf FCMs vorhanden ist. Rst, das Paralog von Duf, wird auf beiden Myoblastenarten exprimiert und geht homophile Bindungen ein, während die Funktion von Hbs, dem Paralog von Sns, bisher ungeklärt ist. Nach der Adhäsion zwischen einer FC und einer FCM wird das Signal zur Fusion über verschiedene Adapterproteine in die Zelle weitergeleitet, das F-Aktin Cytoskelett wird an der Adhäsionsstelle umstrukturiert und die Zellen fusionieren (Önel et al., 2014).

Auch die Testes-relevanten Myoblasten auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles der Genitalscheibe weisen 24 Stunden nach der Verpuppung (24 h APF (after puparium formation)) Duf, Sns und Rst auf. Hierbei sind zwei Zellschichten erkennbar, die sich durch die Expression von Duf oder Rst und Sns unterscheiden. Die innere Zellschicht, also die Testes-relevanten Myoblasten, die ans Epithel der sich entwickelnden Seminal Vesicles angrenzen, exprimieren Duf und Rst, und wurden somit FC-artige Myoblasten genannt. Die Myoblasten der äußeren Zellschicht weisen Sns auf und wurden dementsprechend FCM-artige Zellen genannt (Abb. 3) (Kuckwa et al., 2016).

Muskelspezifische Herunterregulationen von *sns* oder *duf* und *rst* resultieren in Fusionsdefekten, stören die Migration der Muskeln auf die Testes jedoch nicht, was auf zwei voneinander unabhängige Prozesse hindeutet (Kuckwa et al., 2016).



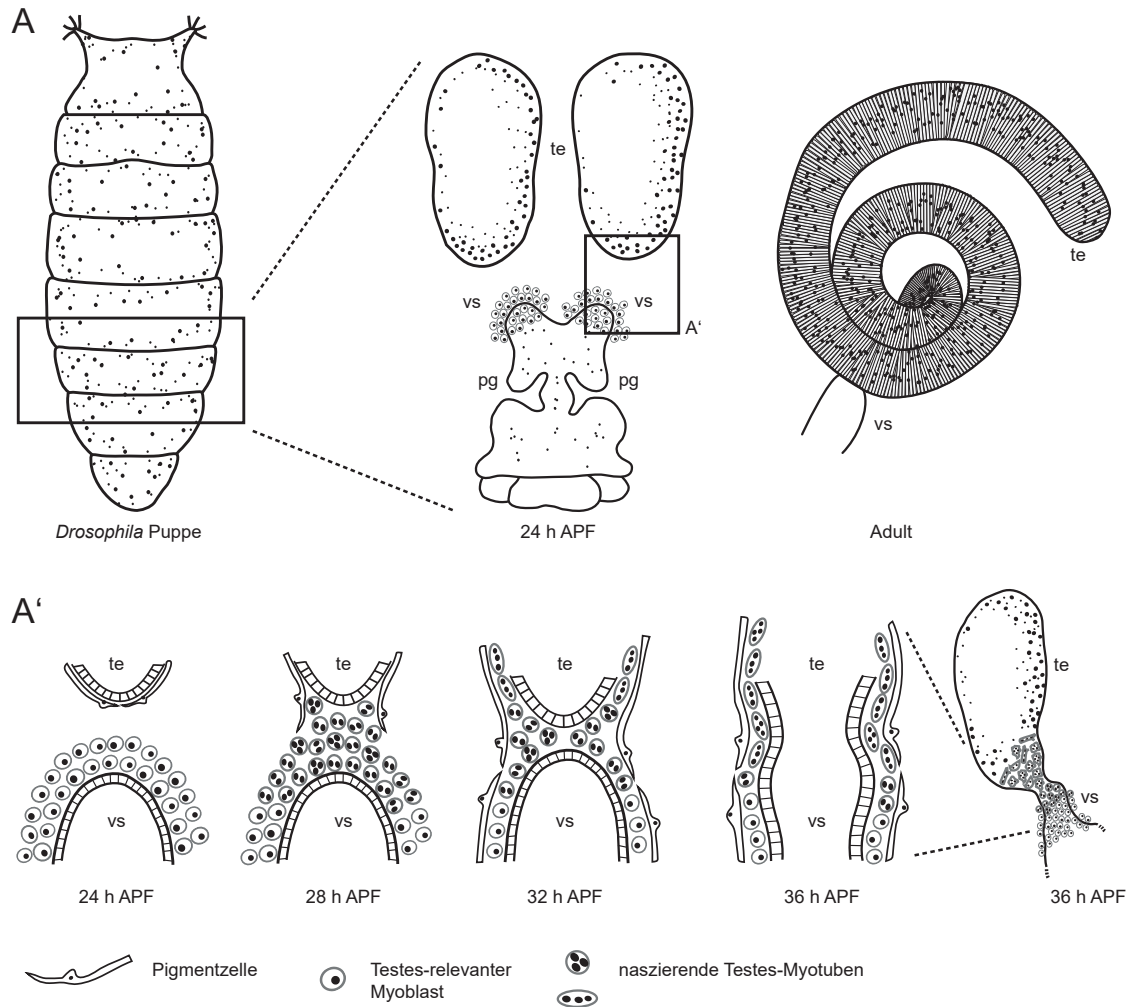
**Abbildung 3: Testes-relevante Myoblasten können in zwei Arten unterteilt werden und fusionieren.** Auf sich entwickelnden Seminal Vesicles (vs) sind bei 24 h APF zwei Zellschichten erkennbar, wobei die innere aus FC-artigen, die äußere aus FCM-artigen Zellen besteht. Die zwei Zelltypen fusionieren ab etwa 28 h APF, um die multinukleären Testismuskeln (Pfeil) zu bilden. te = Testis (modifiziert nach Kuckwa et al., 2016).

### 3.3.5 Migration der naszierenden Testes-Myotuben während der Metamorphose

Erste mehrkernige naszierende Myotuben können etwa 28 h APF auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles beobachtet werden. Etwa zwei Stunden später sind einige Muskeln auf pupalen Testes zu erkennen. Da diese Zellen ausschließlich zwei oder mehr Zellkerne aufweisen, wurde daraus geschlossen, dass die Testes-relevanten Myoblasten auf den auswachsenden Seminal Vesicles zuerst fusionieren und dann mit der Migration beginnen (Kuckwa et al., 2016; Susic-Jung et al., 2012).

Die Migration der naszierenden Testes-Myotuben von den sich entwickelnden Seminal Vesicles auf die pupalen Testes beginnt bei etwa 30 h APF und ist nicht die einzige Migration, die zur Bildung der Testishülle beiträgt. Die adulte Testishülle besteht nicht nur aus der glatten Muskulatur, sondern zusätzlich aus einer die Muskeln umgebenden Schicht aus Pigmentzellen. Während die Myoblasten für die Testismuskulatur von der Genitalscheibe stammen, umgeben die Pigmentzellen ursprünglich die Gonaden. Parallel zur Migration der naszierenden Myotuben auf die Testes wandern die Pigmentzellen in die entgegengesetzte Richtung, also von den Testes auf die auswachsenden Seminal Vesicles (Abb. 4A'). Am Ende der Metamorphose umgeben die Pigmentzellen die Muskeln sowohl der adulten Testes als auch der Seminal Vesicles (Kozopas et al., 1998; Stern und Hador, 1939; Susic-Jung et al., 2012).





**Abbildung 4: Überblick der Migration naszierender Testes-Myotuben in *Drosophila*.** Das männliche Reproduktionssystem entwickelt sich während der Metamorphose. Bei 24 h APF sind die Genitalscheibe und die Testes separate Organe. Die Seminal Vesicles (vs) sowie die Paragonien (pg) beginnen jedoch schon zu wachsen. Im adulten Tier ist der Testisschlauch mit dem Seminal Vesicle verbunden (A). Im Laufe der Metamorphose wachsen die sich entwickelnden Seminal Vesicles und die Testes (te) aufeinander zu und verschmelzen. Auf Genitalscheiben 24 h APF akkumulieren die Testes-relevanten Myoblasten auf den auswachsenden Seminal Vesicles. Die Testes sind von Pigmentzellen bedeckt. Bei 28 h APF fusionieren die Myoblasten und bilden multinukleäre Testes-Myotuben. Diese naszierenden Testes-Myotuben migrieren unter den Pigmentzellen auf die pupalen Testes, während die Pigmentzellen in die entgegengesetzte Richtung wandern. 36 h APF ist das Epithel des Seminal Vesicles mit dem terminalen Epithel des Testis verschmolzen (A') (modifiziert nach Bodenstein, 1950; Kozopas et al., 1998; Kuckwa et al., 2016).

Während der Migration der naszierenden Myotuben sind viele Prozesse noch nicht verstanden. Umformungen des F-Aktin Cytoskeletts sind essentielle Bestandteile der Zellmigration, aber auch die Signale, die Zellen anlocken oder antreiben, sind relevant für eine normal ablaufende Zellmigration (Roca-Cusachs et al., 2013). Chemotaktische Signale könnten verschiedene Signalwege in naszierenden Testes-Myotuben aktivieren und somit die Migration vorantreiben. Diese Prozesse sind jedoch bisher nicht ausreichend untersucht.

### 3.4 Wnt Signalwege sind evolutionär konserviert

Der Name „Wnt“ leitet sich aus einer Kombination von Wingless und Int1 ab, den ersten identifizierten Mitgliedern dieser evolutionär stark konservierten Familie extrazellulärer Signalmoleküle (Rijsewijk et al., 1987). Das Gen *Int1* wurde ursprünglich als ein Onkogen beschrieben, das in Mäusen zur Bildung von Brust-Karzinomen beitrug (Nusse und Varmus, 1982). Das Segmentpolaritätsgen *wingless*, das einige Jahre später in *Drosophila* identifiziert wurde, ist homolog zu *Int1* (Baker, 1987; Cabrera et al., 1987; Rijsewijk et al., 1987). Wnt Liganden und Komponenten der Signalwege sind von Vertebraten bis zu Cnidariern, also in allen Metazoen, zu finden und evolutionär stark konserviert (Holstein, 2012).

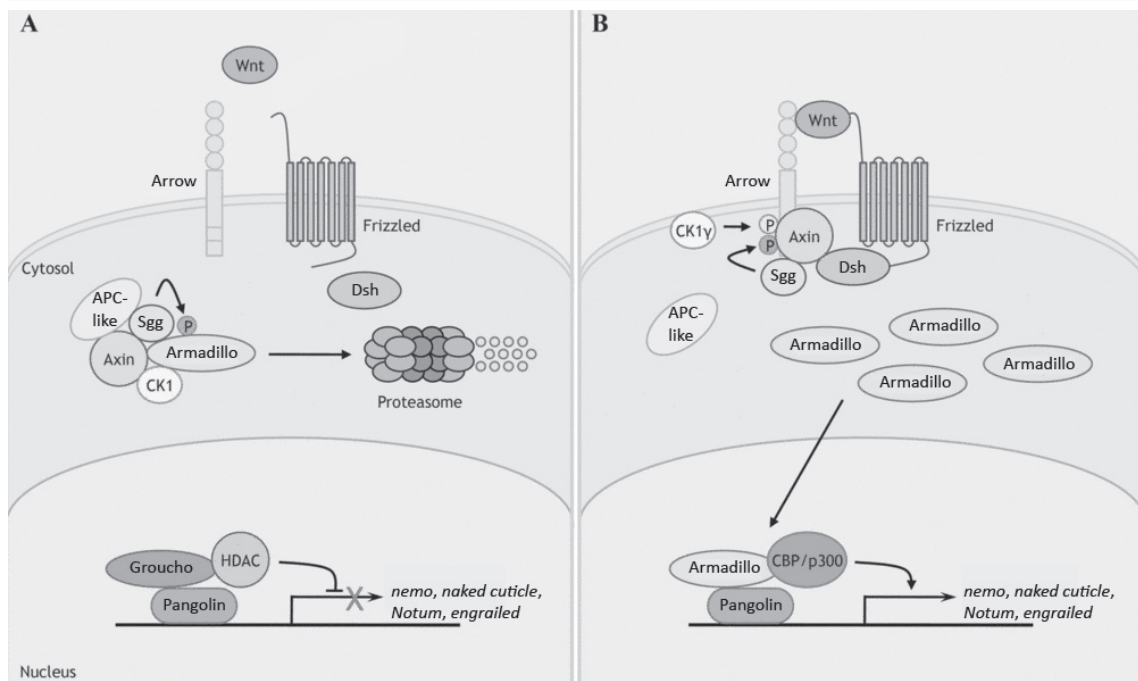
#### 3.4.1 Der kanonische Wnt Signalweg

Der kanonische Wnt Signalweg ist während der Entwicklung eines Organismus von großer Bedeutung. Er zeichnet sich im Gegensatz zu verschiedenen nicht-kanonischen Wnt Signalwegen durch eine der Aktivierung folgende Akkumulation von beta-Catenin (Armadillo in *Drosophila*) im Zellkern aus (Kim et al., 2013).

In der Abwesenheit eines Wnt Liganden wird Armadillo kontinuierlich durch den Degradationskomplex aus Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3, Shaggy in *Drosophila*), Axin, Adenomatous polyposis coli (APC, APC-like in *Drosophila*) und Casein Kinase 1 (CK1) phosphoryliert (Abb. 5A). Die E3 Ligase beta-Transducin repeat-containing protein (beta-TrCP, Supernumerary limbs in *Drosophila*) erkennt Armadillo im phosphorylierten Zustand und markiert es mit Ubiquitin für eine proteasomale Degradation. Dadurch wird das Level von Armadillo im Cytoplasma niedrig gehalten. Im Zellkern ist der Transkriptionsfaktor T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF1, Pangolin in *Drosophila*) mit dem transkriptionellen Repressor Groucho assoziiert, sodass keine Wnt Zielgene aktiviert werden (Kim et al., 2013; Komiya und Habas, 2008; van Amerongen und Nusse, 2009).

Bei Anwesenheit eines Wnt Liganden bindet dieser an einen Frizzled Rezeptor sowie den Co-Rezeptor LDL receptor-related protein (LRP5/6, Arrow in *Drosophila*) (Abb. 5B). Dishevelled bindet an Frizzled und Arrow und überträgt das Signal von den Rezeptoren in Richtung Degradationskomplex. Daraufhin wird Arrow von Shaggy und CK1-gamma phosphoryliert und Axin wird an das phosphorylierte cytoplasmatische Ende von Arrow rekrutiert. Diese Prozesse lösen den Degradationskomplex auf, sodass Armadillo nicht länger phosphoryliert wird. In Folge dessen akkumuliert Armadillo im Cytoplasma der Zelle und kann in den Zellkern gelangen, wo es mit Pangolin interagiert, um Wnt Zielgene zu aktivieren (Kim et al., 2013; Komiya und Habas, 2008; van Amerongen und Nusse, 2009).





**Abbildung 5: Überblick des kanonischen Wnt Signalweges in *Drosophila*.** Bei Abwesenheit eines Wnt Liganden markiert der Degradationskomplex Armadillo für eine proteasomale Degradation. Der transkriptionelle Co-Repressor Groucho bindet an Pangolin und inhibiert die Transkription der Wnt Zielgene (A). Bindet ein Wnt Ligand an Frizzled und Arrow, phosphorylieren Shaggy (Sgg) und CK1-gamma Arrow, Axin bindet an Arrow und der Degradationskomplex löst sich auf. Armadillo akkumuliert im Cytoplasma, transloziert in den Zellkern und bindet an Pangolin, was zur Transkription der Zielgene führt (B). Dsh = Dishevelled (modifiziert nach Kim et al., 2013).

In *Drosophila* sind einige Zielgene, die durch den kanonischen Wnt Signalweg transkriptionell hochreguliert werden, die Gene *nemo* (Zeng & Verheyen, 2004), *naked cuticle* (Zeng et al., 2000), *Notum* (Giráldez et al., 2002) und *engrailed* (Hooper, 1994), sowie *frizzled3*, das für einen der Frizzled Rezeptoren kodiert (Sato et al., 1999). Einige Komponenten des Signalweges werden durch eine Aktivierung wiederum herunterreguliert, darunter die Gene *frizzled* (Müller et al., 1999) und *arrow* (Wehrli et al., 2000).

### 3.4.2 Der kanonische Wnt Signalweg ist in verschiedene Zellmigrationsprozesse involviert

Der kanonische Wnt Signalweg ist in Organismen der verschiedensten evolutionären Stufen in unterschiedlichste Prozesse involviert, darunter auch Zellmigrationsprozesse in der Entwicklung von Organismen (Holstein, 2012; Kim et al., 2013; van Amerongen und Nusse, 2009).

Im Zebrafisch Embryo stellt die Seitenlinienanlage ein *in vivo* Modell für kollektive Zellmigration dar. Die Seitenlinienplakode migriert beim Ohr beginnend entlang des Rumpfes des Embryos und legt entlang des Weges Zellen ab, die sich zu Neuromasten entwickeln, den mechanosensorischen Organen der Seitenlinie. Die Plakode ist ein Cluster von etwas mehr als 100 Zellen, die kollektiv migrieren. Die gerichtete Migration der Plakode wird

durch Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges gesteuert, da die Polarität des Zellverbundes von dieser Aktivierung in den in Führung liegenden Zellen abhängig ist (Aman und Piotrowski, 2008).

Auch in der Migration der Neuralleistenzellen des Zebrafisch Embryos nimmt der kanonische Wnt Signalweg eine wichtige Rolle ein. Frizzled-Wnt Komplexe werden dort internalisiert und es bilden sich multivesikuläre Körper (multivesicular bodies, MVBs), die zu einer erhöhten Aktivität des kanonischen Wnt Signalweges führen. Über die angesteuerten Zielgene wird die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Neuralleistenzellen aktiviert und die Migration beginnt. Defekte in der Bildung der MVBs können dazu führen, dass die Neuralleistenzellen keine EMT durchlaufen und die Migration infolgedessen gestört ist, oder das Zellschicksal der Neuralleistenzellen zu Pigmentzellen ändern (Tuttle et al., 2014).

In *Drosophila* beeinflusst der Wnt Ligand DWnt2 die Bildung des männlichen Reproduktionstraktes und vermutlich die Migration der naszierenden Myotuben von den auswachsenden Seminal Vesicles auf die pupalen Testes. Bei 24 h APF wird *DWnt2* im terminalen Epithel pupaler Testes sowie im Epithel der sich entwickelnden Seminal Vesicles transkribiert. DWnt2 Null-Mutanten weisen adulte Testes auf, denen die Pigmentzellen sowie ein Großteil der Testis-Muskeln fehlen. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das Fehlen der Muskeln auf eine gestörte Migration der naszierenden Testis-Myotuben zurückzuführen ist. Möglicherweise reguliert DWnt2 die Determination oder Migration der Pigmentzellen und die fehlenden Testismuskeln sind nur ein sekundärer Effekt (Kozopas et al., 1998).

### 3.4.3 Nichtkanonische Wnt Signalwege

Zusätzlich zum kanonischen Wnt Signalweg gibt es eine Reihe nicht-kanonischer Wnt Signalwege, wobei in einigen der Signalwege Wnt Liganden an Frizzled-Rezeptoren binden, dabei aber keine Akkumulation von beta-Catenin hervorrufen (Komiya und Habas, 2008). Beispiele hierfür sind sowohl in Vertebraten (Ahumada et al., 2002), als auch in *Drosophila* zu finden (Cohen et al., 2002; Ma et al., 2003). Unter den nicht-kanonischen Signalwegen gibt es zwei, die die Polarität von Zellen während der Migration sowie im Epithel steuern, die planaren Zellpolaritäts-Signalwege (planar cell polarity, PCP) (Ma et al., 2003; Muñoz-Soriano et al., 2012; Simons und Mlodzik, 2008).

#### 3.4.3.1 Das globale PCP Modul

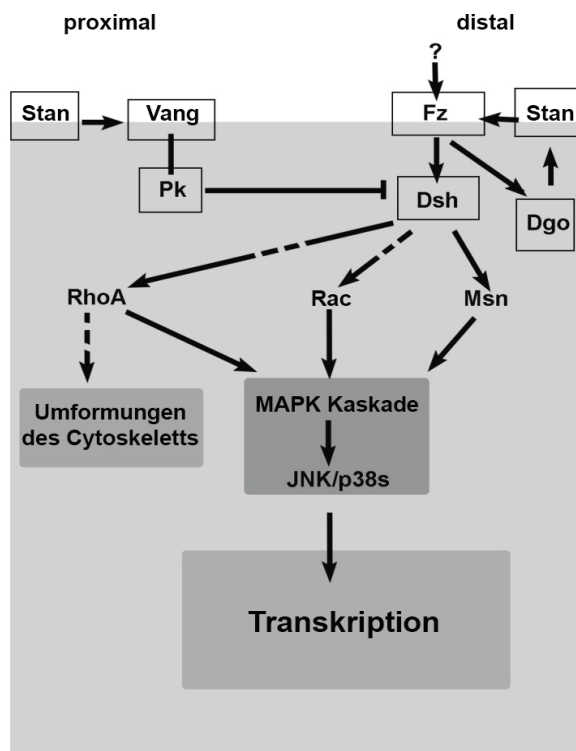
Das globale PCP Modul in *Drosophila* wird auch nach den Hauptkomponenten als Fat/Dachsous System bezeichnet (Muñoz-Soriano et al., 2012). Es vermittelt die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen sowie Zellpolaritäten, aber auch Zellwachstum (Ma et al.,

2003; Maung und Jenny, 2011). Fat sowie Dachsoos sind atypische Cadherine, die über Zellmembranen hinweg heterotypisch interagieren. Ihre Affinität zueinander wird über die Kinase Four-jointed reguliert. Grunge ist ein transkriptioneller Repressor, der an die intrazelluläre C-terminale Domäne von Fat binden kann (Maung und Jenny, 2011). Da *grunge* und *fat* Mutanten vergleichbare Augen-Phänotypen aufweisen, wird davon ausgegangen, dass das globale PCP Modul über Transkriptionskontrolle Zellpolaritäten reguliert (Fanto et al., 2003). Bisher ist jedoch unklar, ob das Fat/Dachsoos System das PCP Kernmodul ansteuern kann oder einen parallel ablaufenden Mechanismus darstellt (Thomas und Strutt, 2012).

### 3.4.3.2 Das PCP Kernmodul

Das sogenannte PCP Kernmodul in *Drosophila* etabliert molekulare Asymmetrie innerhalb und zwischen Zellen, der Verlust der Komponenten führt zu typischen Zellpolaritätsdefekten wie beispielsweise einer gestörten Polarität der Haarzellen (Maung und Jenny, 2011). Komponenten des Moduls umfassen Transmembranproteine wie den Frizzled Rezeptor, Starry night und Van Gogh, aber auch cytoplasmatische Proteine wie Dishevelled, Prickle und Diego (Abb. 6). Frizzled, Dishevelled und Diego sind in distalen Zell-Verbindungen zu finden, während Van Gogh und Prickle proximal in der Zelle lokalisieren. Starry night ist sowohl distal als auch proximal zu finden (Muñoz-Soriano et al., 2012).

Alle Komponenten des PCP Kernmoduls sind konserviert und auch in Vertebraten zu finden, wenn auch unter anderem Namen (Seifert und Mlodzik, 2007). In Vertebraten steuern Wnt Liganden das Modul an, während in *Drosophila* bisher keine Liganden identifiziert wurden. Wenn Frizzled einen entsprechenden Liganden bindet, wird das Signal an Dishevelled übertragen und Diego bindet an Dishevelled (Abb. 6). Prickle kann auch mit Dishevelled interagieren, jedoch inhibieren Van Gogh und Prickle das PCP Signal, während Dishevelled und Diego die Aktivierung weitergeben. Starry night kann als Transmembranprotein, das sowohl proximal als auch distal in Zellen zu finden ist, Homodimere zwischen benachbarten Zellen bilden (Maung und Jenny, 2011). Um das PCP Signal richtig zu verarbeiten, wird eine Vielzahl von Effektoren benötigt, die jedoch nicht spezifisch für das PCP Kernmodul sind. Diese Effektoren sind RhoA und Rac aus der Familie der Rho GTPasen sowie die Kinase Misshapen. Alle drei Proteine können die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Kaskade aktivieren und so indirekt die Transkription von Zielgenen beeinflussen. RhoA kann zusätzlich vermutlich direkt Umformungen des Cytoskeletts hervorrufen, die vor allem für Zellmigrationsprozesse essentiell sind (Maung und Jenny, 2011; Muñoz-Soriano et al., 2012).



**Abbildung 6: Überblick des PCP Kernmoduls in *Drosophila*.** Bei Bindung eines Liganden an Frizzled (Fz) in distalen Zellregionen leitet Dishevelled (Dsh) das Signal an die verschiedenen Effektoren weiter. Die Zellantwort beinhaltet Veränderungen der Transkription sowie Umformungen des Cytoskeletts. Proximal in der Zelle sind Van Gogh (Vang) und Prickle (Pk), die inhibierend auf den Signalweg wirken. Starry night (Stan) ist distal und proximal in Zellmembranen lokalisiert und vermittelt Zellverbindungen. Dgo = Diego; Msn = Misshapen (modifiziert nach Muñoz-Soriano et al., 2012).

#### 3.4.4 Das PCP Kernmodul ist essentiell für viele Zellmigrationen

Das PCP Kernmodul kann verschiedene Effekte auf Zellen haben. Eine wichtige Funktion ist die Vermittlung von Zellpolaritäten während der Migration, beispielsweise in der gerichteten Migration der Photorezeptorzellen auf der Augenimaginalscheibe von *Drosophila* oder während der Gastrulation und Neurulation in Vertebraten (Seifert und Mlodzik, 2007).

Auch die Migration von Neuralleistenzellen in *Xenopus* Embryonen ist vom PCP Kernmodul abhängig. Die Zellen migrieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur gerichtet, wenn die Komponenten des PCP Kernmoduls vorhanden sind. Die Inhibition des Signalweges hebt die Direktionalität der Migration auf, vermutlich weil RhoA nicht aktiviert werden kann (Carmona-Fontaine et al., 2008).

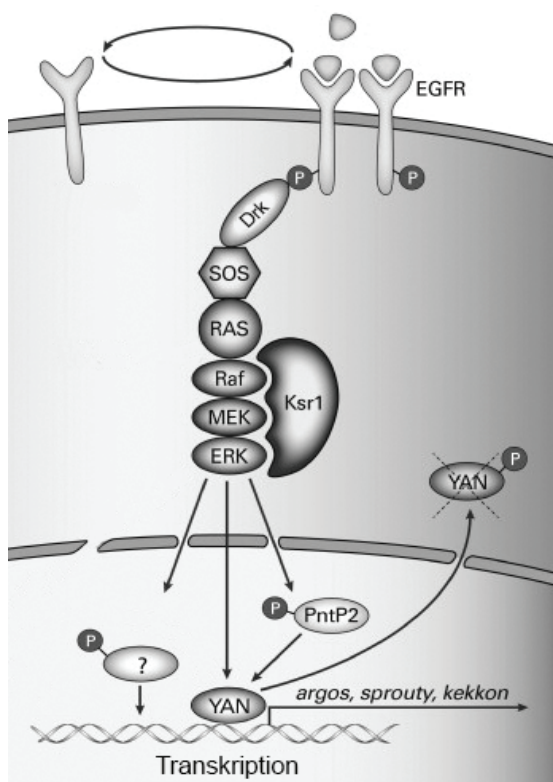
In *Drosophila* wird das PCP Kernmodul neben der Entwicklung der Augen, Borsten und Flügel (Seifert und Mlodzik, 2007) auch in der Oogenese benötigt. Während der „border cell“ Migration ist die Aktivierung des Moduls essentiell für eine normale, kollektive Migration. Der Prozess ist weniger effizient, wenn der Signalweg aufgrund von Mutationen der Komponenten nicht funktionell ist. Die Komponenten des PCP Kernmoduls werden jedoch nicht nur in den als Cluster migrierenden „border cells“ benötigt, sondern auch in den umgebenden Follikelzellen, um eine normale „border cell“ Migration zu gewährleisten. Auch in diesem System ist die weniger effiziente Zellmigration vermutlich auf eine fehlende Aktivierung von RhoA zurückzuführen (Bastock und Strutt, 2007).

### 3.5 MAPK Signalwege sind evolutionär stark konserviert

Viele extrazelluläre Signale kommen bei einer Familie von Serin/Threonin Protein Kinasen an, die MAPKs genannt werden. Alle MAPKs sind Bestandteil einer Kaskade, in der MAP Kinasen Kinasen Kinasen (MAPKKKs) MAP Kinasen Kinasen (MAPKKs) über Phosphorylierung aktivieren, welche wiederum MAPKs phosphorylieren. Die Familie der MAPKs wird in Bezug auf die Aminosäuremotive der Aktivierungsdomäne in drei Gruppen unterteilt: die MAPK, auch Erk (extracellular-signal-related protein kinase) genannt, p38 sowie JNK (c-jun amino-terminal kinase, Basket in *Drosophila*) (Johnson und Lapadat, 2002). Die Kinasen werden von unterschiedlichen Rezeptoren und cytoplasmatischen Proteinen angesprochen und können selbst durch andere Kinasen ersetzt werden, dennoch sind die Phosphorylierungskaskaden innerhalb der verschiedenen Signalwege vergleichbar (Huang et al., 2004; Johnson und Lapadat, 2002).

Der Signalweg der MAPK Erk ist einer der evolutionär am stärksten konservierten, da die cytoplasmatischen Komponenten nicht nur in multizellulären Organismen, sondern auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu finden sind (Chen und Thorner, 2007). In allen multizellulären Organismen läuft der Signalweg nach dem gleichen Prinzip ab, nur die Proteine variieren. Im Folgenden ist ein Signalweg in *Drosophila* dargestellt (Abb. 7).

Nach Bindung eines Liganden an Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs) dimerisieren die Rezeptoren und die cytoplasmatischen Domänen der RTKs werden phosphoryliert.



**Abbildung 7: Überblick des EGFR-aktivierten MAPK Signalweges in *Drosophila*.** Die Bindung der Liganden aktiviert die EGFRs, welche daraufhin dimerisieren und über Phosphorylierung eine Bindestelle für Drk schaffen. Drk aktiviert über Sos den kanonischen Ras/Raf/MEK/Erk Signalweg, bei dem eine Kinase die nächste phosphoryliert. Hierbei fungiert Ksr1 als Gerüst um die Effizienz des Signals zu verstärken. Die MAPK Erk kann den transkriptionellen Repressor Yan phosphorylieren und dessen Abbau im Cytoplasma induzieren. Dadurch wird die Transkription der Zielgene vorangetrieben (modifiziert nach Shilo, 2014).



Adapterproteine wie Downstream of receptor kinase (Drk) und Shc binden an die phosphorylierten Tyrosine und stellen wiederum neue Bindungsstellen zur Verfügung. An diese Stellen kann ein Guanin-Austausch-Faktor (Guanine exchange factor, GEF) wie Sos binden und Ras rekrutieren. Ras wiederum initiiert die Kaskade, bei der drei Kinasen nacheinander phosphoryliert werden: Raf (als MAPKKK), MEK (als MAPKK) und Erk (als MAPK). Während Raf und MEK nur sehr spezifisch die nächste Kinase der Kaskade phosphorylieren können, kann Erk verschiedene cytoplasmatische und nukleäre Proteine phosphorylieren, damit unterschiedliche Zellantworten ermöglicht werden. Beispielsweise kann der über Epidermale Wachstums-Faktoren Rezeptoren (epidermal growth factor receptors, EGFRs) aktivierte Weg zur Transkription der Zielgene *argos*, *sprouty* und *kekkon* führen (Abb. 7) (Shilo, 2014).

### 3.5.1 MAPK Signalwege können verschiedene Zellmigrationsprozesse beeinflussen

Die MAPK Signalwege können viele Zellantworten hervorrufen, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung oder Stressantworten (Johnson und Lapadat, 2002). Auch die Migration von Zellen kann in Vertebraten und Invertebraten durch MAPK Kaskaden beeinflusst werden, wobei die unterschiedlichen MAPKs verschiedene Mechanismen zur Regulation nutzen (Huang et al., 2004).

In *Drosophila* ist der JNK Signalweg essentiell für die Migrationsprozesse im Zuge des embryonalen Dorsalschlusses. *Basket* Mutanten weisen ebenso wie *hemipterous* Mutanten Defekte im Dorsalschluss auf, wobei Hemipterous die MAPKK von der JNK Basket ist (Glise et al., 1995; Riesgo-Escovar et al., 1996; Sluss und Davis, 1997). Während der Embryonalentwicklung von Mäusen ist das Schließen der Augenlider von der Migration epithelialer Zellen abhängig. Dieser Prozess ist mit dem Dorsalschluss im *Drosophila* Embryo vergleichbar. In JNK-defizienten sowie MEKK1-defizienten Embryonen sind die Augenlider nicht geschlossen, da die Migration der Epithelzellen gestört ist (Weston et al., 2003; Yujiri et al., 2000). MEKK1 ist eine MAPKKK, die den JNK Signalweg ansteuert (Yujiri et al., 2000). JNK kann verschiedene Substrate ansteuern, die das F-Aktin Cytoskelett beeinflussen oder die Adhäsion zwischen Zellen vermitteln können und reguliert somit die Migration von Zellen (Huang et al., 2004; Ríos-Barrera und Riesgo-Escovar, 2013).

Die MAPK p38 ist ebenfalls in die Migration verschiedener Zellen involviert (Huang et al., 2004). In Lungentracheen von Hunden reguliert p38 die Migration glatter Muskeln, Inhibition des Signalweges führt zur Blockierung der Migration (Hedges et al., 1999). Auch in Lungentracheen von Mäusen resultiert die Inhibition von p38 in stark verringerter Migra-

tion der glatten Muskeln (Kotlyarov et al., 2002). Fibroblasten aus MK2-defizienten Mäuse-Embryonen weisen ebenfalls eine stark verringerte Fähigkeit zur Migration auf, wobei MK2 ein Substrat der p38 MAPK ist (Kotlyarov et al., 2002). p38 kann ebenso wie JNK über verschiedene Proteine die Dynamik des F-Aktin Cytoskeletts beeinflussen und die Zellmigration regulieren (Huang et al., 2004).

Die MAPK Erk kann ebenfalls über verschiedene Mechanismen die Migration von Zellen beeinflussen (Huang et al., 2004). Beispielsweise konnte in Vertebraten Zellen gezeigt werden, dass Erk1 und Erk2 die Kinase MLCK (myosin light chain kinase) phosphoryliert und dadurch deren Aktivität erhöht. MLCK wiederum phosphoryliert die leichten Ketten des Myosins. Dementsprechend führt die Inhibition der MAPK Aktivitäten von Erk1 und Erk2 zu einer verringerten Funktion der MLCK. Die leichten Myosin Ketten werden weniger phosphoryliert und die Zellmigration wird gestört (Klemke et al., 1997). In Fibroblasten werden die Zelladhäsionen an die extrazelluläre Matrix (extracellular matrix, ECM) EGF-induziert aufgelöst. Das Auflösen dieser Fokalen Adhäsionen ist essentiell für die Migration der Fibroblasten auf der ECM. Die Inhibition des Erk Signalweges führt dazu, dass die Fokalen Adhäsionen nicht aufgelöst werden können und dementsprechend die Migration der Fibroblasten stark beeinträchtigt ist (Xie et al., 1998). Erk kann neben den erwähnten Mechanismen verschiedene Proteine aktivieren, die Zelladhäsionen sowie Fokale Adhäsionen auflösen und somit die Zellmigration begünstigen. Außerdem führt die Regulation von Myosin zu Membranausstülpungen, die für die Zellmigration wichtig sind (Huang et al., 2004).

### **3.5.2 Die MAPKKKK Misshapen ist in *Drosophila* an Zellmigrationsprozessen beteiligt**

Die Kinase Misshapen (Msn) ist eine Ste20-artige MAPKKKK in *Drosophila*. Das Msn-Homolog in Säugetieren ist die Kinase NIK (NCK-interacting kinase), in *Caenorhabditis elegans* ist es Mig-15 (Su et al., 1998). Msn wird im *Drosophila* Embryo während der Gastrulation im invaginierenden Mesoderm exprimiert sowie in weiteren Zellen, die während der Entwicklung eine Migration oder Veränderung der Zellform durchlaufen (Treisman et al., 1997). In den Augen bewirken *msn* Mutationen morphologische Defekte der Photorezeptorzellen (Treisman et al., 1997).

Ein essentieller Prozess während der Entwicklung von *Drosophila* ist der embryonale Dorsalschluss. Hierbei wird ein Loch in der dorsalen Epidermis geschlossen, indem zwei gegenüberliegende Epithelschichten aufeinander zu wandern und sich zu einer Schicht verbinden. Gestörte Zellmigrationsprozesse der Epithelzellen lassen sich anhand von Löchern in der

dorsalen Epidermis erkennen (Heisenberg, 2009). Da Embryonen mit Mutationen im *msn* Gen vergleichbare Dorsalschluss-Defekte aufweisen wie *basket*- oder *hemipterous*-Mutanten, wurde Msn als eine Komponente des JNK Signalweges identifiziert, wo sie als MAPKKKK fungiert (Su et al., 1998). Während des Dorsalschlusses wird Msn zusätzlich in den Epithelzellen für die richtige Lokalisation von F-Aktin und Myosin II benötigt sowie für die daraus abgeleitete Verengung der Zellen (Köppen et al., 2006).

Auch in der „border cell“ Migration spielt Msn eine wichtige Rolle, „border cells“ mit Mutationen in *msn* zeigen einen kompletten Migrationsstopp. Die Clusterbildung sowie die Verteilung von Shotgun (E-Cadherin) innerhalb der „border cells“ ist ebenfalls gestört. Jedoch konnte hier gezeigt werden, dass Msn in diesem Kontext unabhängig vom JNK Signalweg wirkt (Cobrerros-Reguera et al., 2010). In Ovarien übernimmt Msn außerdem eine Funktion in den Follikelzellen, um deren Migration voranzutreiben. Hier unterstützt Msn die Bewegung der Follikelzellen Zell-autonom, indem die Kinase Integrin-Level auf der basalen Zelloberfläche reduziert (Lewellyn et al., 2013).

Neben dem JNK Signalweg kann Msn als Komponente anderer Signalwege fungieren. So ist Msn beispielsweise ein Effektor des PCP Kernmoduls und bewirkt vom Frizzled Rezeptor angesteuert die planare Zellpolarität in Augen und Flügeln (Paricio et al., 1999). Außerdem wurden Beteiligungen am Warts-Yorkie Signalweg in Stammzellen des Darms (Li et al., 2014) sowie am Notch Signalweg beschrieben (Mishra et al., 2015).

### 3.6 FGF Signalwege sind essentiell in multizellulären Organismen

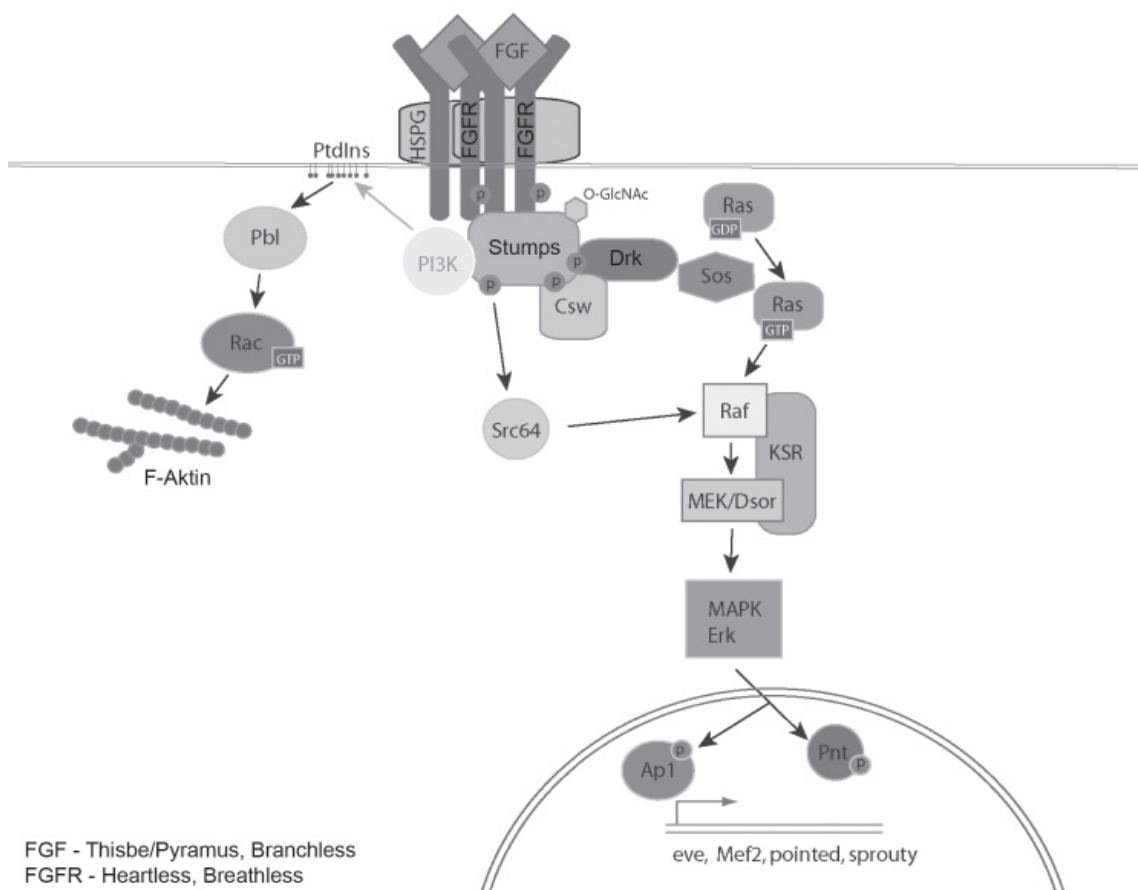
Die Familie der FGF Liganden sowie der dazugehörigen RTKs (FGF Rezeptoren, FGFRs) ist essentiell für die Entwicklung vielzelliger Organismen und funktionell konserviert. So kann der FGFR Kringelchen aus *Hydra vulgaris* den FGFR Heartless in *Drosophila* zumindest teilweise ersetzen (Rudolf et al., 2013). In Mäusen und Menschen sind 22 FGF Proteine beschrieben, von denen 18 als Liganden an vier verschiedene FGFRs binden können. Die restlichen vier FGFs sind intrazelluläre Proteine, die nicht mit FGFRs interagieren (Brewer et al., 2016; Olsen et al., 2003; Smallwood et al., 1996). Bei Bindung eines FGF Liganden an einen FGFR kommt es zur Dimerisierung und Phosphorylierung der Rezeptoren, daraufhin wird das Signal über Adapterproteine ins Zellinnere übertragen. Hierbei können beispielsweise der Erk- oder JNK-MAPK Signalweg angesteuert und verschiedenste Zellantworten hervorgerufen werden. In Vertebraten regulieren FGF Signalwege unter anderem die Spezifizierung des primitiven Endoderms in der Blastocyste, die Haut- und Knochen-Bildung, sowie die postnatale Proliferation der Knorpelzellen (Brewer et al., 2016).



### 3.6.1 FGF Signalwege in *Drosophila*

In *Drosophila* sind zwei FGFRs sowie drei FGF Liganden exprimiert. Die beiden FGFRs Breathless (Btl) und Heartless (Htl) sind an verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt (Muha und Müller, 2013). Btl wurde zuerst in der Tracheenentwicklung beschrieben (Glazer und Shilo, 1991), der spezifische Ligand ist Branchless (Bnl) (Sutherland et al., 1996). Htl hingegen ist an der Invagination des Mesoderms beteiligt (Shishido et al., 1993) und kann die beiden Liganden Thisbe (Ths) und Pyramus (Pyr) binden (Gryzik und Müller, 2004; Stathopoulos et al., 2004).

Bei der Bindung von Ths/Pyr an Htl oder Bnl an Btl bildet der jeweilige Rezeptor Homodimere aus, die Interaktion mit dem Liganden sowie die Dimerisierung wird durch Heparan Sulfat Proteoglykane (HSPGs) stabilisiert (Abb. 8).



**Abbildung 8: Schematischer Überblick des FGF Signalweges in *Drosophila*.** FGF Liganden binden spezifisch an die FGFRs, welche daraufhin dimerisieren. HSPGs stabilisieren die Bindung. Die intrazellulären Kinase Domänen der FGFRs sowie das Adapterprotein Stumps werden phosphoryliert. Stumps kann über Src64B, Csw oder Drk die Erk MAPK Kaskade aktivieren und somit die Transkription der Zielgene induzieren. Möglicherweise kann Stumps auch über PI3K und Veränderung der Membranzusammensetzung Pbl und Rac ansteuern, die wiederum das F-Aktin Cytoskelett regulieren. Die putative Komponente PI3K wird durch einen Kreis ohne Umrandung dargestellt, der graue Pfeil zeigt eine putative Interaktion an (modifiziert nach Muha und Müller, 2013)

Die Aktivierung der FGFRs führt zur auto- und trans-Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase Domänen sowie zur Phosphorylierung des Adapterproteins Stumps (wird auch Heartbroken (Hbr), Downstream of FGF (Dof) genannt) (Imam et al., 1999; Michelson et al., 1998; Vincent et al., 1998). Stumps wiederum besitzt mehrere Tyrosin Cluster, die das Signal der Aktivierung an verschiedene Kaskaden weiterleiten können. Drei dieser Kaskaden, die von Corkscrew (Csw), Src64B oder Drk angesteuert werden, führen zur Aktivierung des Erk MAPK Signalweges. Darüber wird die Transkription von Zielgenen wie *Mef2* reguliert. Stumps besitzt ebenfalls eine putative Bindestelle für die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die lokal die Phosphatidylinositol (PtdIns) Zusammensetzung der Membran verändern kann. Diese Veränderung könnte zur Rekrutierung des Rho-GEF Pebble (Pbl) führen und über Rac das F-Aktin Cytoskelett beeinflussen (Abb. 8) (Muha und Müller, 2013).

### 3.6.2 FGF Signalwege sind an vielen Migrationsprozessen in *Drosophila* beteiligt

Die FGF Signalwege sind an vielen entwicklungsbiologischen Prozessen in *Drosophila* beteiligt (Muha und Müller, 2013). Auch für die Regulation der Migration verschiedener Zellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten sind FGFs essentiell.

Htl wird während der Gastrulation im Mesoderm exprimiert (Shishido et al., 1993), wo der Htl- abhängige FGF Signalweg für die EMT benötigt wird, in dessen Ablauf individuelle Zellen dorsolateral am Ektoderm entlang migrieren. In Embryonen mit Mutationen im *htl*, *ths* oder *pyr* Gen bildet sich das Mesoderm zwar aus, jedoch kann keine dorsolaterale Migration beobachtet werden (Gisselbrecht et al., 1996; Gryzik und Müller, 2004). Während der Embryogenese von *Drosophila* übernehmen Htl, Ths und Pyr außerdem eine wichtige Rolle in der Migration der FCs der longitudinalen Muskeln des Mitteldarms vom kaudalen viszeralen Mesoderm in Richtung anterior. Pyr und Ths sind hierbei essentiell, um die migrierenden FCs auf das richtige Substrat sowie entlang dieses Substrats zu führen (Kadam et al., 2012; Reim et al., 2012).

Der andere FGFR, Btl, wird in embryonalen Tracheen sowie in Gliazellen des embryonalen zentralen Nervensystems exprimiert (Glazer und Shilo, 1991). Mutationen in *btl* bewirken dementsprechend Defekte im Tracheensystem und der Mittellinie des zentralen Nervensystems. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Phänotypen auf Störungen der gerichteten Migration von Gliazellen der Mittellinie sowie von trachealen Zellen zurückzuführen sind (Klämbt et al., 1992)

Auch während der Entwicklung der Reproduktionsorgane spielen die FGF Signalwege

eine Rolle. Weibchen mit Mutationen im *ths* Gen sind steril, die Ovarien weisen eine gestörte Morphologie auf und die Muskeln um die Ovariolen fehlen. Da die Herunterregulation von *htl* zu vergleichbaren Defekten führt, wird angenommen, dass ein Htl-abhängiger FGF Signalweg die richtige Ausbildung der Ovarien Muskulatur steuert (Irizarry und Stathopoulos, 2015). In der Entwicklung des männlichen Reproduktionssystems konnte ebenfalls die Aktivierung eines FGF Signalweges gezeigt werden. Bnl rekrutiert in der Larve mesodermale Zellen auf die männliche Genitalscheibe, die dessen Rezeptor Btl exprimieren. Diese mesodermalen Zellen werden ein Teil der Genitalscheibe, entwickeln sich zu Epithelzellen und bilden die Epithelien der Paragonien und Seminal Vesicles (Ahmad und Baker, 2002).

### 3.7 Zielsetzung

Über die Entwicklung der glatten Muskulatur um die adulten Testes von *Drosophila* ist bisher relativ wenig bekannt. Ab etwa 28 Stunden nach Beginn der Metamorphose fusionieren Testes-relevante Myoblasten auf der Genitalscheibe, die resultierenden naszierenden Myotuben migrieren im weiteren Verlauf von den auswachsenden Seminal Vesicles auf die pupalen Testes (Kuckwa et al., 2016). Der Prozess der Migration der naszierenden Testes-Myotuben wurde bisher nur ansatzweise verstanden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird damit begonnen, diesen Migrationsprozess zu analysieren. Hierbei sollen Proteine oder Signalwege identifiziert werden, die die Migration steuern. Dazu werden 25 Fliegenlinien mit GFP-Insertionen in Genen untersucht, die für Proteine mit Zellmigrationsrelevanz oder Komponenten verschiedener Signalwege kodieren. In sich entwickelnden männlichen Reproduktionssystemen wird nach einer spezifischen Expression in Testes-relevanten Myoblasten oder naszierenden Testes-Myotuben gesucht.

Zur gezielten Manipulation der Migration mithilfe von RNAi-vermittelter Herunterregulation wird nach Gal4-Treiberlinien gesucht, die die Expression spezifisch in Testes-relevanten Myoblasten treiben.

Um den oder die Signalwege zu identifizieren, die die naszierenden Myotuben auf die pupalen Testes locken oder die weitere Migration in Richtung Testisspitze vermitteln, werden verschiedene Signalwege analysiert.

Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges werden mithilfe von RT-PCRs sowie *in situ* Hybridisierungen auf Transkriptebene untersucht. Die Komponenten werden mittels RNAi Myoblasten-spezifisch herunterreguliert und mutante Wnt Allele analysiert.

Einige Komponenten der PCP Signalwege werden ebenfalls auf Transkriptebene untersucht. Funktionelle Analysen werden mittels RNAi-Versuchen durchgeführt.

Die Focal adhesion kinase wird auf Transkriptebene überprüft sowie eine mögliche Funktion während der Testes-Myotuben Migration mithilfe von RNAi untersucht.

Die MAPKKKK Misshapen wird mittels Myoblasten-spezifischem RNAi-vermitteltem knock-down bezüglich einer Regulation der Migration analysiert.

Komponenten der FGF Signalwege werden Myoblasten-spezifisch herunterreguliert und die resultierenden Reproduktionstrakte werden auf Migrationsdefekte hin untersucht.

Mithilfe von *ex vivo* Co-Kulturen aus Genitalscheiben und pupalen Testes werden „live imaging“ Experimente durchgeführt, um die Migration der naszierenden Myotuben auf den Testes zu verfolgen und zu manipulieren.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Das Expressionsmuster der *frizzled2*-GFP Enhancertrap Linie weist auf den Wnt Signalweg als Regulator der Migration naszierender Testes-Myotuben hin

Um mögliche Proteine und Signalwege zu identifizieren, die an der Migration naszierender Myotuben von der Genitalscheibe auf die Testes beteiligt sein könnten, wurde eine Vielzahl von GFP-Trap und Enhancertrap Linien untersucht. Fliegen dieser Linien weisen eine GFP-Insertion im Gen als zusätzliches Exon des zu untersuchenden Gens auf oder ein GFP ist in die Nachbarschaft eines genomischen Enhancers inseriert, weshalb das GFP-Signal das Gewebe der Expression widerspiegelt (Buszczak et al., 2007). Anhand des GFP-Signals können Rückschlüsse auf eine Expression des untersuchten Proteins in Testes-relevanten Myoblasten oder naszierenden Testes-Myotuben gezogen werden. Eine solche Expression würde auf eine Beteiligung an der Migration der naszierenden Myotuben hindeuten.

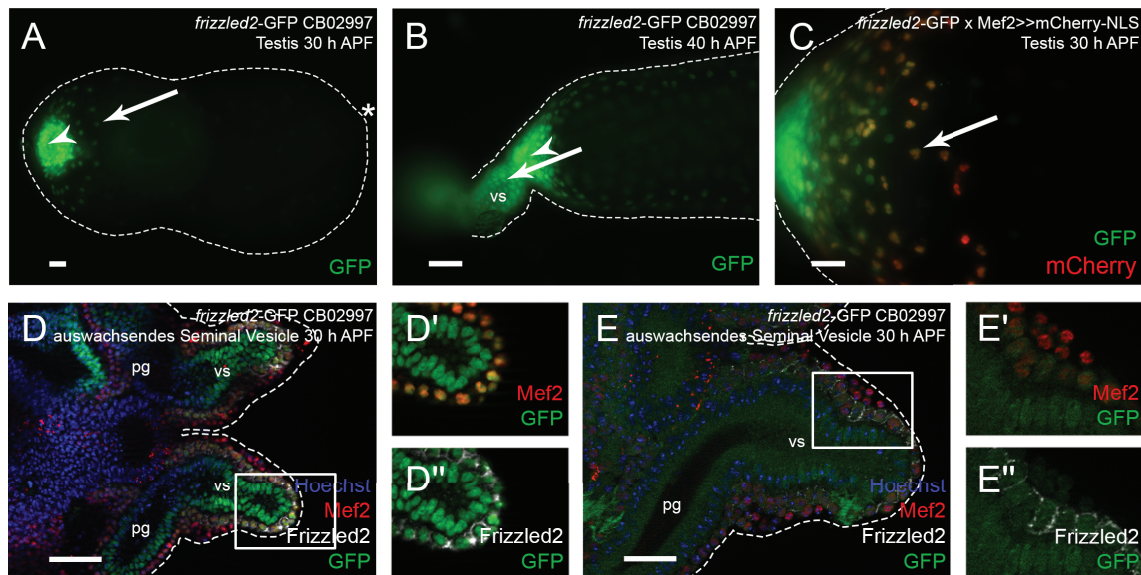
Der Fokus lag beispielsweise auf Komponenten des Wnt Signalweges, da es Hinweise für die Beteiligung von DWnt2 an der Migration der Myotuben gab (Kozopas et al., 1998). STAT92E (Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E, Yan et al., 1996) wurde als Komponente des JAK/STAT Signalweges analysiert. Da anzunehmen ist, dass Zellmigration in Abhängigkeit einer ECM verläuft, wurden mit Trol (Terribly reduced optic lobes, Voigt et al., 2002) und Viking (Yasothornsrikul et al., 1997) Komponenten der ECM untersucht, wobei die Expression von Trol bereits in der adulten Testishülle gezeigt wurde (Susic-Jung et al., 2012).

Weiterhin wurden mit Fak (Focal adhesion kinase, Palmer et al., 1999) und Misshapen (Treisman et al., 1997) zwei Kinasen analysiert, die die Zellmigration beeinflussen können (Lewellyn et al., 2013; Serrels et al., 2011). Die Proteine Endophilin A (Lloyd et al., 2000) und Mrtf (Myocardin-related transcription factor, Han et al., 2004) sowie Pico (das *Drosophila* Ortholog von Lamellipodin, Lyulcheva et al., 2008) wurden untersucht, weil deren Orthologe in Säugetieren an Zellmigrationsprozessen beteiligt sind (Law et al., 2013; Majumdar et al., 2013; Pipes et al., 2006).

Zur Auswertung wurden Genitalscheiben und pupale Testes bei 30 h APF sowie adulte männliche Reproduktionstrakte präpariert und an einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse der Analysen der GFP-Traps sind in Tabelle A1 zusammengefasst. Außerdem sind die GFP-Expressionsmuster einiger Linien im Anhang (Abb. A1-A5) gezeigt.

Bei der Analyse der Linien stellte sich der *frizzled2*-GFP Enhancertrap als vielversprechend dar. Pupale Testes 30 h APF zeigten eine punktuelle GFP-Expression in der Hülle am

basalen Testisende (Abb. 9 A, Pfeil). Bei Testes 40 h APF fiel auf, dass diese Expression ebenso in der Hülle sich entwickelnder Seminal Vesicles zu sehen war (Abb. 9 B, Pfeil). Zusätzlich wiesen Testes bei 30 h sowie 40 h APF GFP-Signale im terminalen Epithel auf (Abb. 9 A, B, Pfeilköpfe). Um herauszufinden, ob es sich bei diesen Punkten um die Zellkerne naszierender Myotuben handelt, wurden Tiere der Enhancertrap Linie mit solchen gekreuzt, die Muskel-spezifisch mCherry-NLS exprimieren. Auf Testes 30 h APF konnte eine teilweise Co-Lokalisation des GFP-Signals mit dem mCherry-Signal gezeigt werden (Abb. 9 C Pfeil). Zusätzlich wurde an *frizzled2*-GFP Genitalscheiben bei 30 h APF die Expression von Mef2 sowie Frizzled2 (Fz2) mithilfe von Antikörpern analysiert (Abb. 9 D-E“). GFP wurde zwar in Mef2- und Fz2-positiven Myoblasten (Abb. 9 D‘-E“) exprimiert, jedoch auch im darunterliegenden Epithel der auswachsenden Seminal Vesicles, in dem der Antikörper kein Fz2 detektierte.



**Abbildung 9: *frizzled2*-GFP ist teilweise in Zellkernen von Testes-Myotuben aktiv.** Charakterisierung der *frizzled2*-GFP Enhancertrap Linie. Das GFP-Signal spiegelt *frizzled2*-GFP wider, Mef2-getriebenes mCherry-NLS markiert die Zellkerne der naszierenden Myotuben. Am basalen Ende pupaler Testes 30 h APF ist eine punktförmige GFP-Expression (Pfeil) in der Testishülle erkennbar, ebenso im terminalen Epithel (Pfeilkopf) (A). Auf Testes 40 h APF ist diese Expression erhalten, zusätzlich weist die Hülle des sich entwickelnden Seminal Vesicles (vs) punktförmige GFP-Signale auf (Pfeil) (B). Pupale Testes 30 h APF weisen eine teilweise Co-Lokalisation zwischen GFP und mCherry-NLS auf (Pfeil) (C). Genitalscheiben 30 h APF zeigen eine GFP-Expression in Mef2- sowie Fz2-positiven Myoblasten Zellen, jedoch auch im Epithel des sich entwickelnden Seminal Vesicles (D-E“). Das Sternchen markiert die Hubregion, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Der *frizzled2*-GFP Enhancertrap spiegelt demnach nicht ausschließlich die zelltypspezifische endogene Fz2-Expression wider. Die endogene subzelluläre Lokalisation in der Zellmembran ist nicht erkennbar, zudem sind mehr Zellen GFP-positiv als Fz2-positiv. Da es sich bei der untersuchten Linie um eine Enhancertrap Linie handelt (Buszczak et al., 2007),



können aufgrund der GFP-Expression Rückschlüsse auf eine Expression im untersuchten Gewebe gezogen werden. Daher ist dieses Ergebnis ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Wnt-Signalweges an der Migration naszierender Testes-Myotuben, welche im weiteren Verlauf dieser Arbeit überprüft wurde.

#### **4.2 Die Suche nach neuen Gal4-Treiberlinien, die für die Migration geeignet sind, ist noch nicht abgeschlossen**

Um die Migration der Testes-Myotuben untersuchen und spezifisch manipulieren zu können, wurde nach einem geeigneten Gal4-Treiber gesucht. Die bereits etablierte Treiberlinie Mef2-Gal4 treibt die Expression in allen Myoblasten von *Drosophila* (Mef2, Rangayakulu et al., 1995), während C855a-Gal4 hauptsächlich in der adulten Testishülle treibt (Hrdlicka et al., 2002; Susic-Jung et al., 2012). Daher wurden bei der Suche verschiedene Treiberlinien getestet, die spezifisch in den Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe bzw. in den Muskeln adulter Testes die Expression induzieren. Tiere der jeweiligen Gal4-Treiberlinien wurden mit UAS-mCD8-GFP-tragenden Tieren gekreuzt, Genitalscheiben und pupale Testes und/oder adulte Reproduktionsorgane wurden präpariert und ausgewertet.

Fünf verschiedene Treiberlinien, die in der adulten Testishülle die Expression treiben sollen (Hrdlicka et al., 2002), wurden analysiert. Zusätzlich wurden zwei Komponenten des Wnt Signalweges (Kim et al., 2013) sowie zwei Twist-Treiberlinien untersucht. Die Ergebnisse der Analysen der Gal4-Treiberlinien sind in Tabelle A2 zusammengefasst. Hierbei zeigte keine der Treiberlinien eine spezifische Expression in allen Testes-relevanten Myoblasten. Exemplarisch sind die Expressionsmuster von vier Linien im Anhang gezeigt und teilweise genauer charakterisiert (Abb. A6-A8).

Da unter den getesteten Gal4-Treiberlinien keine war, die das gewünschte Expressionsmuster aufwies, wurde für die weiteren Analysen auf die Linien Mef2-Gal4 sowie C855a-Gal4 zurückgegriffen.

#### **4.3 Untersuchungen des kanonischen Wnt Signalweges bezüglich einer möglichen Steuerung der Migration von Testes-Myotuben**

Frühere Veröffentlichungen postulierten, dass DWnt2 entweder direkt oder indirekt über Beeinflussung der Pigmentzellwanderung die Migration von Testes-Myotuben beeinflussen könnte (Kozopas et al., 1998). Daher wurde bei der Suche nach Signalwegen, die diese Migration steuern, zuerst auf den kanonischen Wnt Signalweg konzentriert.

### 4.3.1 Wnt Komponenten werden in Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert

Um herauszufinden, ob die Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges in Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert werden, wurden RT-PCRs durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA bzw. mRNA aus dem Gesamt-Pool der Myoblasten von Genitalscheiben unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte eingesetzt (Kuckwa et al., 2016). Transkripte von allen erfolgreich überprüften Komponenten konnten in Myoblasten zwischen 8 h APF und 30 h APF nachgewiesen werden (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Übersicht der RT-PCRs von Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges

<b>Wnt Komponenten</b>					
<b>Gen</b>	<b>8 h APF</b>	<b>16 h APF</b>	<b>24 h APF</b>	<b>26 h APF</b>	<b>30 h APF</b>
<i>frizzled</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>frizzled2</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+ *
<i>frizzled3</i>	-	+	+	+	+
<i>frizzled4</i>	+	+	+	+	+
<i>arrow</i>	+	+	+	+	+
<i>Axin</i>	+	+	+	+	+
<i>shaggy</i>	+	+	+	+	+
<i>APC-like</i>	-	+	+	+	+
<i>armadillo</i>	+	+	+	+	+
<i>groucho</i>	+	+	+	+	+
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl</i> <sup>p4D</sup> (neg.)	-	-	-	-	-

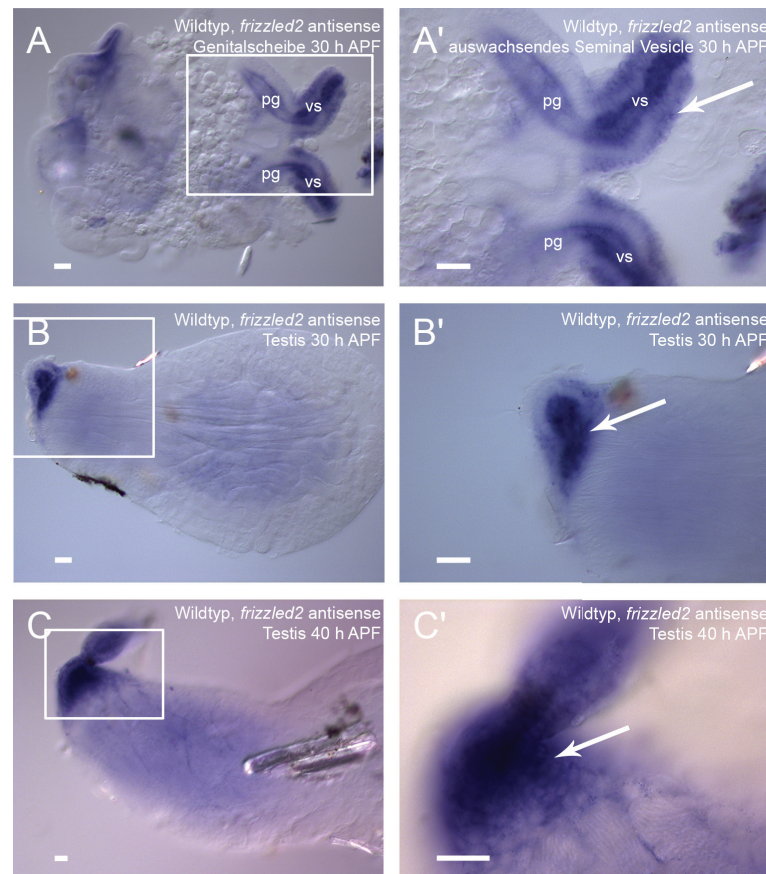
+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; \* = an mRNA getestet; n.d. = nicht erfolgreich durchgeführt; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Um die Verteilung der Transkripte zu untersuchen sowie herauszufinden, ob die Komponenten auch in naszierenden Myotuben transkribiert werden, die bereits auf die Testes gewandert sind, wurden für einige Komponenten *in situ* Hybridisierungen an Genitalscheiben und Testes 30 h APF sowie Testes 40 h APF durchgeführt.

Die *fz2* antisense-Sonde detektierte mRNA im vorderen Teil einer Genitalscheibe 30 h APF (Abb. 10 A). Die Signale waren in Myoblasten sowie im Epithel auf auswachsenden Seminal Vesicles zu sehen (Abb. 10 A'). In pupalen Testes 30 h APF wurden am basalen Ende Transkripte detektiert (Abb. 10 B). Die Vergrößerung zeigte, dass diese Transkripte im terminalen Epithel der Testes lokalisieren (Abb. 10 B', Pfeil). Bei 40 h APF konnten ebenfalls Signale am basalen Ende der Testes detektiert werden (Abb. 10 C), die das terminale Epithel markierten (Abb. 10 C', Pfeil).

Die *armadillo* (*arm*) antisense-Sonde zeigte Signale im Cytoplasma naszierender Myotuben auf Testes 30 h und 40 h APF (Abb. A9).





**Abbildung 10: Transkripte von *frizzled2* lokalisieren in Myoblasten über den Seminal Vesicles und im terminalen Epithel von pupalen Testes.** *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Genitalscheiben und Testes mithilfe einer *fz2* antisense-Sonde. Der vordere Teil einer Genitalscheibe 30 h APF weist Signale auf (A), die in Myoblasten (Pfeil) auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) sowie in den Epithelien von Seminal Vesicle und Paragonium (pg) lokalisieren (A'). Bei 30 h APF (B, B') und 40 h APF (C, C') sind *fz2* Transkripte im terminalen Epithel der Testes detektierbar (Pfeile). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Die *in situ* Hybridisierungen für *frizzled3*, *arrow* (*arr*) und *pangolin* (*pan*) brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Exemplarisch ist die *in situ* Hybridisierung für *arr* im Anhang (Abb. A10) gezeigt.

Dennoch deuten die Ergebnisse der RT-PCRs sowie der *in situ* Hybridisierungen darauf hin, dass die getesteten Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges in Testes-relevanten Myoblasten sowie naszierenden Testes-Myotuben zum Zeitpunkt der Migration transkribiert werden.

#### 4.3.2 Bekannte Zielgene des kanonischen Wnt Signalweges werden in Myoblasten transkribiert

Nach dem Nachweis der Transkription kanonischer Wnt Komponenten in Testes-relevanten Myoblasten und naszierenden Testes-Myotuben sollte überprüft werden, ob einige der bekannten Zielgene des Signalweges ebenfalls transkribiert werden.

Die Gene *nemo* (Zeng & Verheyen, 2004), *naked cuticle* (Zeng et al., 2000), *Notum* (Giráldez et al., 2002) sowie *engrailed* (Hooper, 1994) werden durch den aktiven Wnt Signal-

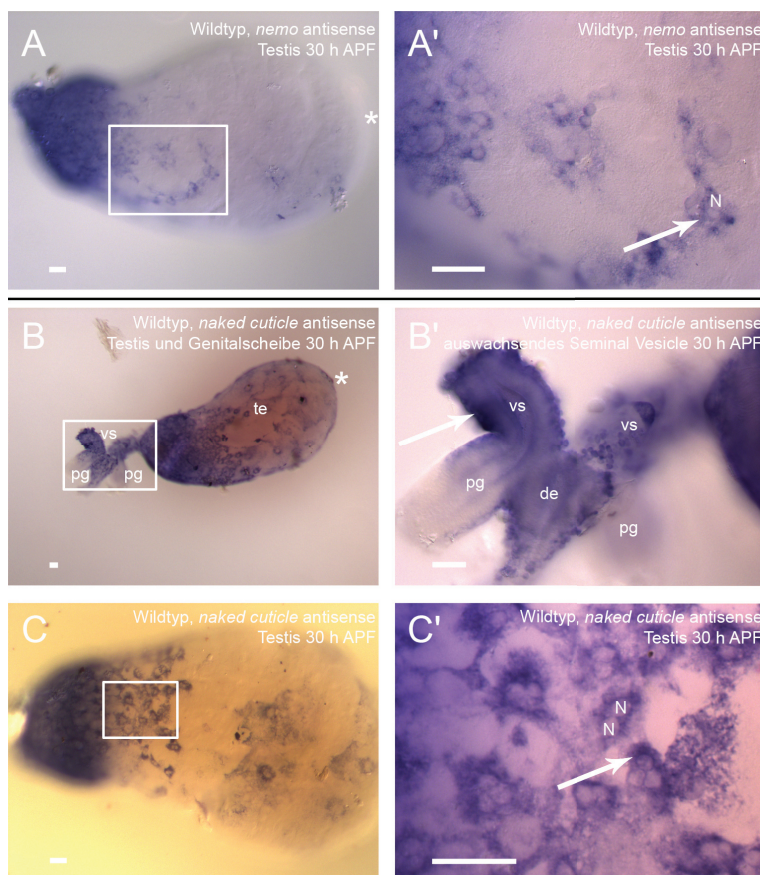
weg transkriptionell hochreguliert. Deshalb wurde die Transkription dieser Gene mittels RT-PCR an Gesamt-RNA aus allen Myoblasten der Genitalscheibe überprüft. Transkripte von *nemo*, *naked cuticle* und *engrailed* konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden, während *Notum* zu keinem Zeitpunkt transkribiert wurde (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Übersicht der RT-PCRs von Zielgenen des kanonischen Wnt Signalweges

<b>Wnt Zielgene</b>					
<b>Gen</b>	<b>8 h APF</b>	<b>16 h APF</b>	<b>24 h APF</b>	<b>26 h APF</b>	<b>30 h APF</b>
<i>nemo</i>	+	+	+	+	+
<i>naked cuticle</i>	+	+	+	+	+
<i>Notum</i>	-	-	-	-	-
<i>engrailed</i>	+	+	+	+	+
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl</i> <sup>94D</sup> (neg.)	-	-	-	-	-

+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Um Informationen über die Transkriptverteilung innerhalb der Zellen zu erhalten, wurden *in situ* Hybridisierungen für *nemo* und *naked cuticle* durchgeführt. Die antisense-Sonde für *nemo* detektierte Transkripte am basalen Ende des Testis bei 30 h APF (Abb. 11 A), die im Cytoplasma der naszierenden Myotuben lokalisierten (Abb. 11 A', Pfeil). Genitalscheiben konnten in diesem Fall nicht erfolgreich analysiert werden.



**Abbildung 11: Transkripte der Wnt-Zielgene *nemo* und *naked cuticle* sind in naszierenden Testes-Myotuben detektierbar.** *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Genitalscheiben und Testes mithilfe von *nemo* und *naked cuticle* antisense-Sonden. In der Testishülle bei 30 h APF (A, A') sind *nemo* Transkripte im Cytoplasma naszierender Myotuben detektierbar (Pfeil) (A'), die Zellkerne (Nuklei, N) bleiben frei. Der vordere Teil einer Genitalscheibe 30 h APF weist Signale der *naked cuticle* Sonde auf (B), die in Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) lokalisieren (Pfeil) (B'). Auf Testes 30 h APF sind Transkripte detektierbar (C). Sie lokalisieren im Cytoplasma naszierender Myotuben (Pfeil), Zellkerne (N) bleiben frei (C'). te = Testis; pg = Paragonium; de = Ductus ejaculatus. Sternchen markieren die Hubregionen, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Maßstabsbalken: 20 µm.

Für *naked cuticle* detektierte die antisense-Sonde im vorderen Bereich einer Genitalscheibe 30 h APF Transkripte (Abb. 11 B), die in den Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles waren (Abb. 11 B', Pfeil). Pupale Testes 30 h APF zeigten wie bei *nemo* cytoplasmatische Signale in naszierenden Myotuben (Abb. 11 C, C', Pfeil).

Die mittels RT-PCR sowie teilweise *in situ* Hybridisierung nachgewiesene Transkription der Wnt Zielgene *nemo*, *naked cuticle* und *engrailed* deutet darauf hin, dass der kanonische Wnt Signalweg in Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe sowie naszierenden Myotuben auf den Testes aktiv sein könnte. Daher wurden weitere Untersuchungen dieses Signalweges durchgeführt.

#### **4.3.3 Ein Frizzled2-abhängiger kanonischer Wnt Signalweg könnte in naszierenden Testes-Myotuben aktiv sein**

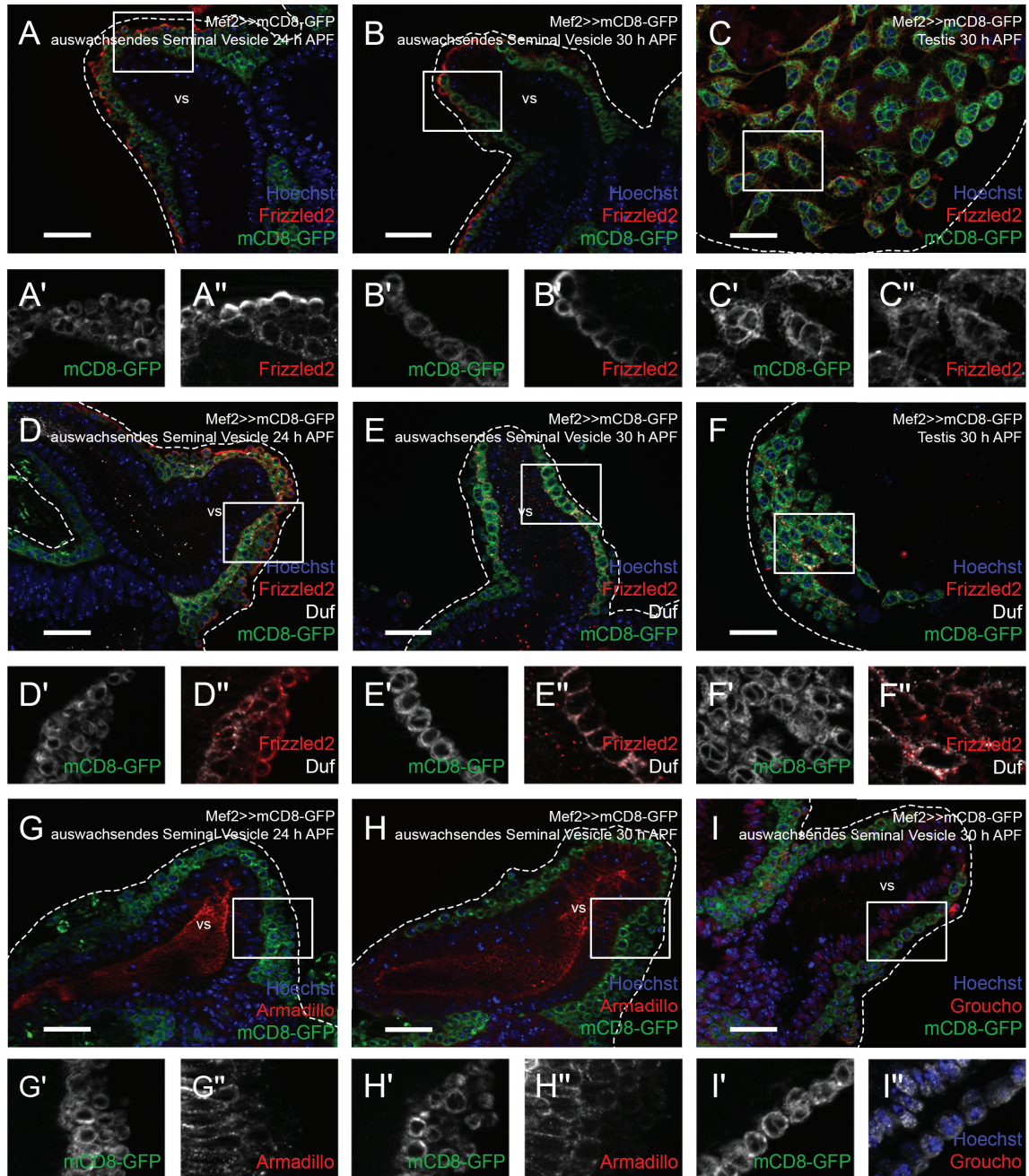
Um zusätzlich zum Transkriptionsmuster die Expression von kanonischen Wnt Komponenten zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben und pupalen Testes durchgeführt. Hierzu wurden Fliegen genutzt, die Mef2-getriebenes UAS-mCD8-GFP tragen, sodass die Myoblasten und Myotuben markiert sind. Bei der Auswertung ist zu beachten, dass dieser Marker primär im Cytoplasma dieser Zellen lokalisiert. Der Fz2 Antikörper detektierte das Protein in der Membran von Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 24 h APF (Abb. 12 A-A'') sowie 30 h APF (Abb. 12 B-B''), hierbei schien das Protein auf den nach außen gerichteten Seiten der Zellmembranen zu akkumulieren. Auch in naszierenden Myotuben auf pupalen Testes 30 h APF konnte Fz2 membranständig nachgewiesen werden (Abb. 12 C-C'').

Testes-relevante Myoblasten bilden bei 24 h APF zwei Schichten auf den auswachsenden Seminal Vesicles, die innen gelegenen FC-artigen Myoblasten und die äußeren FCM-artigen Zellen (Kuckwa et al., 2016). Um zu analysieren, ob Fz2 spezifisch nur in einem Myoblastentyp auf dem auswachsenden Seminal Vesicle exprimiert wird, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen Duf eingesetzt. Duf wird nur in FC-artigen Myoblasten exprimiert, die die innere Zellschicht der Testes-relevanten Myoblasten auf dem auswachsenden Seminal Vesicle bilden (Kuckwa et al., 2016). Auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 24 h APF co-lokalisierte Fz2 in FC-artigen Myoblasten mit Duf, jedoch exprimierte auch die äußere Zellschicht Fz2 (Abb. 12 D-D''). Bei 30 h APF waren Fz2 und Duf in allen naszierenden Myotuben auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles (Abb. 12 E-E'') sowie den Testes (Abb. 12 F-F'') exprimiert.

Da eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges eine Akkumulation von Arm



im Cytoplasma sowie die daraus resultierende Translokation in den Zellkern bewirkt (Kim et al., 2013), wird diese Akkumulation oft als Nachweis für eine Aktivität des Signalweges verwendet (Hall and Verheyen, 2015). In Testes-relevanten Myoblasten auf Genitalscheiben konnte jedoch weder bei 24 h APF (Abb. 12 G-G“) noch bei 30 h APF (Abb. 12 H-H“) eine Akkumulation von Arm beobachtet werden. Auch eine Translokation in den Zellkern konnte nicht beobachtet werden. Arm lokalisierte zu beiden Zeitpunkten membranständig in Myoblasten sowie Epithelzellen der auswachsenden Seminal Vesicle (Abb. 12 G‘-G“, H‘-H“).



**Abbildung 12: Frizzled2, Armadillo und der transkriptionelle Co-Repressor Groucho sind in naszierenden Myotuben detektierbar.** Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben und pupalen Testes. Myoblasten sowie naszierende Myotuben sind durch Mef2>>mCD8-GFP markiert, die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt. Der Fz2-Antikörper detektiert den Rezeptor in der Membran von Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) 24 h APF (A-A“) sowie von naszierenden Myotuben auf Seminal Vesicles (B-B“) und Testes (C-C“) bei 30 h APF. Bei 24 h APF co-lokalisiert Fz2 mit Duf in FC-artigen Testes-relevanten Myo-

blasten, jedoch ist Fz2 auch in Duf-negativen Myoblasten exprimiert (D-D“). Auf Seminal Vesicles (E-E“) und Testes (F-F“) 30 h APF co-lokalisieren Fz2 und Duf in der Membran aller naszierenden Myotuben. In Testes-relevanten Myoblasten ist Arm sowohl bei 24 h APF (G-G“) als auch bei 30 h APF (H-H“) membranständig detektierbar, eine Akkumulation im Zellkern ist nicht erkennbar. Bei 30 h APF ist Gro auf auswachsenden Seminal Vesicles im Cytoplasma naszierender Myotuben sowie von Epithelzellen detektierbar (I-I“). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstab-balken: 20 µm.

Das Protein Groucho (Gro) fungiert im kanonischen Wnt Signalweg als transkriptioneller Co-Repressor, der im Zellkern an Pangolin bindet. Bei einer Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges wird Gro durch Arm aus dem Zellkern entlassen (Kim et al., 2013). Auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 30 h APF konnte Gro im Cytoplasma der naszierenden Myotuben sowie Epithelzellen, jedoch nicht in Zellkernen detektiert werden (Abb. 12 I-I“).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz Analysen implizieren, dass der kanonische Wnt Signalweg in naszierenden Myotuben auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles aktiviert ist. Auch wenn bei 24 h APF sowie 30 h APF keine Akkumulation von Arm beobachtet werden konnte, deutet dennoch die Lokalisation von Gro im Cytoplasma auf eine Aktivierung hin. Hierbei könnte Fz2 der benötigte Rezeptor sein.

#### 4.3.4 Muskelspezifische Herunterregulation von *frizzled2* und *armadillo* beschädigt die Testismuskulatur

Da die postulierte Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges die Migration der Testes-Myotuben beeinflussen könnte, wurden funktionelle Analysen an verschiedenen kanonischen Wnt Komponenten mittels RNAi durchgeführt. Hierzu wurden die Treiberlinien C855a-Gal4, Mef2-Gal4 oder UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 verwendet, wobei C855a-Gal4 nicht auf der Genitalscheibe treibt und deshalb als Kontrolle verwendet wurde. Die adulten, männlichen Reproduktionsorgane der resultierenden F<sub>1</sub>-Generationen wurden mithilfe von Cytoskelett- und Kern-Färbungen bezüglich der Muskulatur analysiert, ebenso wurde die Fertilität ermittelt. Die Ergebnisse der RNAi-vermittelten Herunterregulationen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse für *fz2* (Abb. 13) und *arm* (Abb. 14) gezeigt, ein Teil der restlichen Kreuzungen befindet sich im Anhang (Abb. A11-A15).

**Tabelle 3:** Übersicht RNAi-vermittelter knock-downs kanonischer Wnt Komponenten

Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Reproduktionsorgane	Fertilität
C855a>> <i>fz2</i> -RNAi	Mu – wt	100 %
BL27568	Mo – wt	

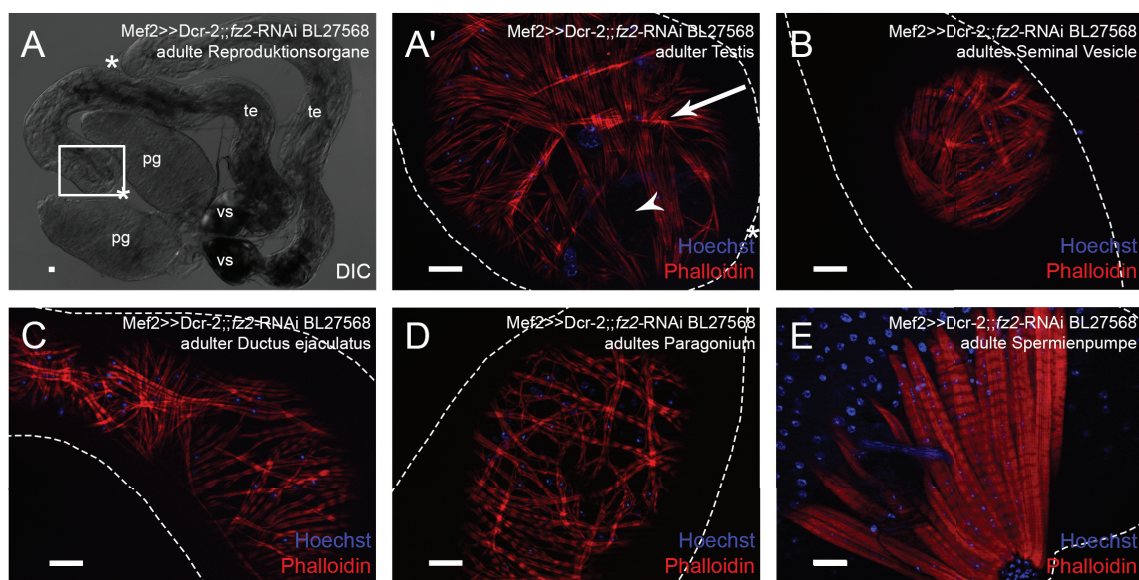
Mef2>> <i>fz2</i> -RNAi BL27568	Mu – TE, VS, PG, DE: misorientierte, übereinander laufende Muskeln, Löcher; SP: wt Mo – TE: klein und dünn, nicht gerollt; VS, PG, DE: klein und dick	8 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;fz2</i> -RNAi BL27568*	Mu – TE, VS, PG, DE: misorientierte, übereinander laufende Muskeln, Löcher; SP: wt Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; VS, PG, DE: klein und dick	0 %
C855a>> <i>fz2</i> -RNAi BL31312	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>fz2</i> -RNAi BL31312	Mu – wt Mo – wt	93 %
C855a>> <i>fz2</i> -RNAi BL31390	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>fz2</i> -RNAi BL31390	Mu – TE, VS, PG, DE: misorientierte, übereinander laufende Muskeln, z.T. Löcher; SP: wt Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; VS, PG, DE: klein und dick	0 %
Mef2>> <i>fz2</i> -RNAi v44391 <sup>p</sup>	Mu – wt Mo – wt	97 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;fz2</i> -RNAi v44391**/ <sup>p</sup>	Mu – wt Mo – TE: sehr leichte Defekte in der Hubregion; Rest wt	100 %
Mef2>> <i>arr</i> -RNAi BL31313	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;arr</i> -RNAi BL31313	Mu – wt Mo – wt	90 %
Mef2>> <i>arr</i> -RNAi BL31473	Mu – wt Mo – wt	0 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;arr</i> -RNAi BL31473**	Mu – PG: übereinander laufende Muskeln; Rest wt Mo – wt	20 %
Mef2>> <i>arr</i> -RNAi BL53342	Mu – wt Mo – wt	83 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;arr</i> -RNAi BL53342	Mu – DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – wt	93 %
Mef2>> <i>Apc</i> -RNAi v51468	Mu – DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – wt	90 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;Apc</i> -RNAi v51468**	Mu – DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – wt	80 %
Mef2>> <i>sgg</i> -RNAi v101538	Mu – TE: Löcher in der Hubregion; Rest wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>Dcr-2;;sgg</i> -RNAi v101538**	Mu – TE: große Löcher in der Hubregion; Rest wt Mo – TE: verdickte Spitze; PG, DE: klein und dünn; Rest wt	0 %
Mef2>> <i>arm</i> -RNAi BL31304*	Mu – TE: kurze Muskeln, viele Löcher; Rest wt Mo – TE: viele kleine Verdickungen; Rest wt	60 %



Mef2>>Dcr-2;; <i>arm</i> -RNAi BL31304	Mu – DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – wt	n.d.
Mef2>> <i>arm</i> -RNAi BL35004	Mu – wt Mo – wt	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>> <i>pan</i> -RNAi v108679	Mu – wt Mo – wt	97 %
Mef2>>Dcr-2; <i>pan</i> -RNAi v108679**	Mu – TE: leichte Defekte in der Hubregion; Rest wt Mo – wt	83 %

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; TE = Testis; VS = Seminal Vesicle; DE = Ductus ejaculatus; PG = Paragonium; SP = Spermiumpumpe; wt = wildtypisch; n.d. = nicht durchgeführt; <sup>1</sup> viele embryonal lethal; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang; <sup>p</sup> = Protein nicht herunterreguliert

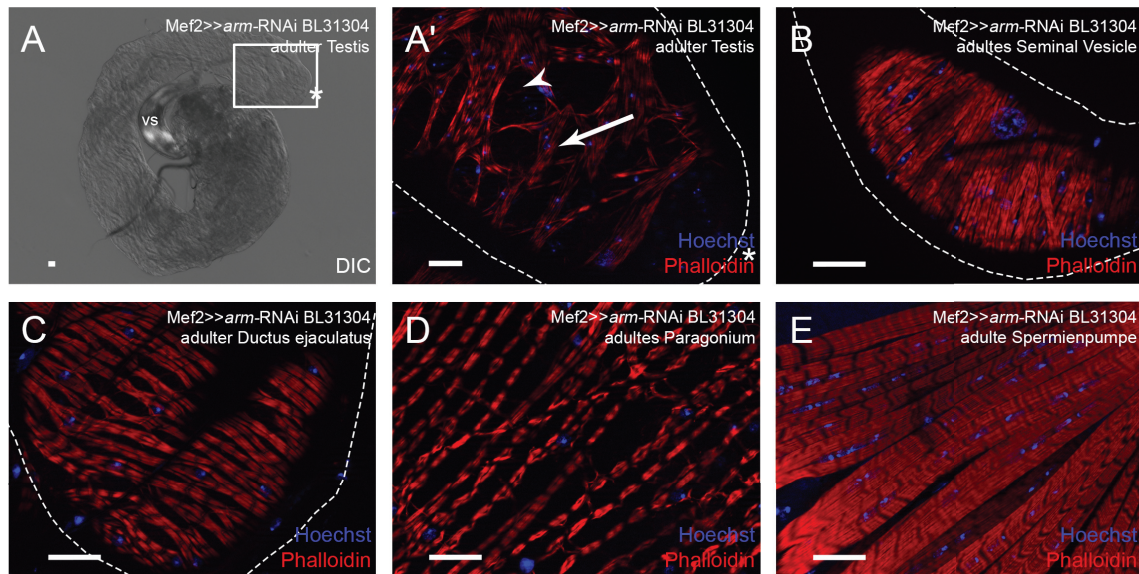
Die Herunterregulation von *fz2* mithilfe der Treiberlinie UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 führte zu morphologischen Defekten der Reproduktionsorgane. Die Testes waren nicht gerollt, sondern besaßen Windungen in verschiedene Richtungen, Seminal Vesicles sowie Paragonien waren klein und verdickt (Abb. 13 A). Die Testismuskulatur wies übereinanderliegende, misorientierte Muskeln (Abb. 13 A; Pfeil) sowie in der Hubregion einige Löcher auf (Abb. 13 A', Pfeilkopf). Auch die Muskelschichten um die Seminal Vesicles (Abb. 13 B), den Ductus ejaculatus (Abb. 13 C) und die Paragonien (Abb. 13 D) wiesen einige misorientierte Muskeln auf. Lediglich die Muskeln der Spermiumpumpe waren wildtypisch (Abb. 13 E). Männliche Tiere dieses Genotyps waren steril (0%, Tab. 3, Abb. A16).



**Abbildung 13: Der muskelspezifische *fz2*-knock-down resultiert in starken Defekten der Reproduktionstrakt-Muskulatur.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;;*fz2*-RNAi exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Reproduktionsorgane ist stark gestört. Die Testes (te) winden sich in verschiedene Richtungen, die Paragonien (pg) sowie Seminal Vesicles (vs) sind klein und verdickt (A). Die Testismuskulatur weist misorientierte Muskeln (Pfeil) und Löcher in der Hubregion (Pfeilkopf) auf (A'). Die Muskeln der Seminal Vesicles (B), des Ductus ejaculatus (C) sowie der Paragonien (D) weisen ebenfalls misorientierte Muskeln auf. Die Muskeln der Spermiumpumpe erscheinen wildtypisch (E). Das Sternchen markiert die Hubregion, der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



Der muskelspezifische knock-down von *arm* mittels RNAi resultierte in adulten Testisschläuchen, die keine glatte Oberfläche besaßen, sondern viele kleine Verdickungen aufwiesen. Außerdem machten die Testes statt 2,5 Umdrehungen wie im Wildtyp (Abb. 4) nur eine Umdrehung (Abb. 14 A). Die Testismuskeln erschienen kürzer als normal (Abb. 14 A', Pfeil) und hatten Zwischenräume zwischen benachbarten Muskeln (Abb. 14 A', Pfeilkopf). Die restlichen Muskeln des Reproduktionstraktes waren jedoch wildtypisch (Abb. 14 B-E). Die Fertilität dieser Männchen war vermindert (60%, Tab. 3, Abb. A17).



**Abbildung 14: Die muskelspezifische Herunterregulation von *armadillo* stört die Adhäsion zwischen benachbarten Testismuskeln und die Formgebung der Testes.** Analyse von adulten *Mef2>>arm-RNAi* exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Der Testisschlauch weist viele kleine Verdickungen und nur eine statt 2,5 Umdrehungen auf (A). Die Testismuskeln sind kurz (Pfeil) und adhären nicht richtig, sodass Zwischenräume entstehen (Pfeilkopf) (A'). Die Muskeln der Seminal Vesicles (B), des Ductus ejaculatus (C) der Paragonien (D) sowie der Spermiumpumpe (E) erscheinen wildtypisch. Das Sternchen markiert die Hubregion, der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Ergebnisse der Herunterregulation verschiedener kanonischer Wnt Komponenten suggerieren eine Beteiligung des kanonischen Wnt Signalweges an der Entwicklung der Testismuskulatur. Gerade die durch muskelspezifisch exprimierte *shaggy* (*sgg*) RNAi erzielten Löcher in der Hubregion deuten auf einen Migrationsdefekt hin. Der muskelspezifische *pan-* knock-down führt zu leichten Testismuskel-Defekten in der Hubregion, wohingegen der *arr-* sowie der *APC-like* (*Apc*)-knock-down keine Defekte der Testismuskulatur verursachen. Die starken, aber unterschiedlichen Defekte durch *fz2-* und *arm-*knock-down implizieren, dass weitere Analysen des Wnt Signalweges bezüglich der Testismuskulatur erforderlich sind.

#### 4.3.5 Pangolin beeinflusst die Fusion Testes-relevanter Myoblasten

Die Mehrkernigkeit der adulten Testismuskeln entsteht durch Myoblastenfusion

(Kuckwa et al., 2016). Da die Testismuskeln nach der Herunterregulation verschiedener kanonischer Wnt Komponenten teilweise nicht mehrkernig erschienen (Abb. A14 B), wurde die Anzahl der Zellkerne bestimmt, um Hinweise auf Fusionsstörungen zu erhalten. Hierzu wurden pupale Testes bei 42 h APF präpariert, die muskelspezifisch verschiedene Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges RNAi-vermittelt herunterreguliert hatten. Die zu diesem Zeitpunkt noch einzeln liegenden naszierenden Testes-Myotuben wurden mithilfe eines Antikörpers gegen Tropomyosin markiert, sodass durch die zusätzliche Kernfärbung mit Hoechst die Anzahl der Zellkerne pro naszierender Myotube bestimmt werden konnte (siehe 8.3.4 sowie Kuckwa et al., 2016). Anhand der Mittelwerte der  $F_1$ -Generation sowie der ungetriebenen RNAi (Effektorlinie) wurde der Fusionsindex anhand folgender Formel bestimmt:

$$F_i = \frac{\text{durchschnittliche Kernzahl pro Muskel } F_1\text{-Generation}}{\text{durchschnittliche Kernzahl pro Muskel Effektorlinie}}$$

Anhand des berechneten Fusionsindex erfolgte eine Klassifizierung der vorliegenden Fusionsdefekte nach folgendem Schema:

$F_i > 0,8$	kein Fusionsdefekt
$0,8 \geq F_i \geq 0,7$	schwacher Fusionsdefekt
$0,7 > F_i > 0,55$	moderater Fusionsdefekt
$0,55 \geq F_i \geq 0,35$	starker Fusionsdefekt
$0,35 > F_i$	Fusionsblock

Die Ergebnisse der Kernzählungen für die Komponenten Fz2, Pan, Sgg und Apc sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Kernzahlbestimmungen verschiedener kanonischer Wnt Komponenten

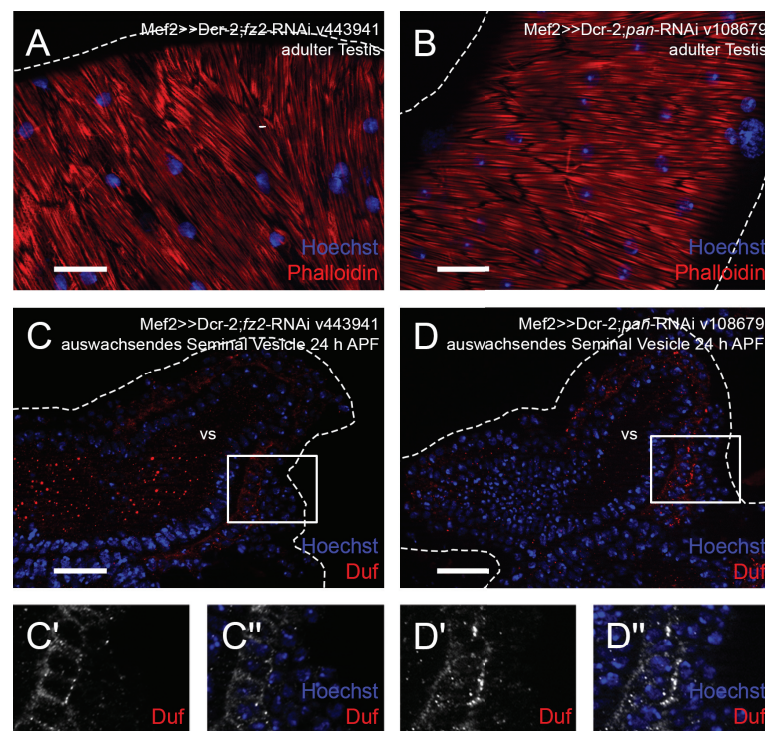
Kreuzung	Kernzahl $F_1$ -Generation	Kernzahl Effektorlinie	Fusionsindex $F_i$	Fusionsdefekt
Mef2>>Dcr-2; <i>fz2</i> -RNAi BL27568	2,4	3,1	0,77	schwach
Mef2>> <i>fz2</i> -RNAi v44391	2,9	3,3	0,88	kein
Mef2>>Dcr-2; <i>fz2</i> -RNAi v44391*	2,7	3,3	0,82	kein
Mef2>> <i>Apc</i> -RNAi v51468	3	3	1	kein
Mef2>>Dcr-2; <i>sgg</i> -RNAi v101538	2,8	2,5	1,12	kein

Mef2>> <i>pan</i> -RNAi v108679	2,8	2,8	1	kein
Mef2>>Dcr-2; <i>pan</i> -RNAi v108679*	2,1	2,8	0,75	schwach

\* = wird näher charakterisiert

Da der durch Dcr-2 verstärkte muskelspezifische *pan*-knock-down in einem schwachen Fusionsdefekt resultierte (Tab. 4), wurde diese Linie näher charakterisiert. Um zu untersuchen, ob der Fusionsdefekt durch eine veränderte oder fehlende Expression des FC-spezifischen IgSF-Moleküls Duf hervorgerufen wurde, wurden Genitalscheiben bei 24 h APF analysiert. Zusätzlich wurde die Duf Expression auf Genitalscheiben 24 h APF analysiert, in denen *fz2* muskelspezifisch herunterreguliert wurde.

In der adulten Testishülle konnte weder beim knock-down von *fz2* (Abb. 15 A) noch von *pan* (Abb. 15 B) eine eindeutige Aussage zur Kernzahl pro Muskel getroffen werden. Auf auswachsenden Mef2>>Dcr-2;*fz2*-RNAi exprimierenden Seminal Vesicles 24 h APF war Duf in FC-artigen Myoblasten exprimiert (Abb. 15 C-C''), bei der Herunterregulation von *pan* konnte kein Unterschied in der Expression von Duf festgestellt werden (Abb. 15 D-D'').



**Abbildung 15: Der muskelspezifische knock-down von *pangolin* oder *frizzled2* beeinflusst nicht die Expression von Duf.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*fz2*-RNAi oder Mef2>>Dcr-2;*pan*-RNAi exprimierenden Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die adulten Testismuskeln lassen sowohl bei Herunterregulation von *fz2* (A) als auch von *pan* (B) keine Rückschlüsse auf die Kernzahl zu. Genitalscheiben 24 h APF exprimieren Duf in FC-artigen Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs), unabhängig davon, ob *fz2* (C-C'') oder *pan* (D-D'') in den Myoblasten herunterreguliert ist. Kästen kennzeichnen die vergrößerten Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Allerdings konnte bei einer Überprüfung der *fz2*-Herunterregulation mithilfe des Fz2-Antikörpers ein wildtypisches Signal in Myoblasten detektiert werden (Abb. A18). Diese RNAi-Linie funktioniert demnach nicht effizient.

Die wildtypische Expression von Duf beim *pan*-knockdown lässt darauf schließen, dass der schwache Fusionsdefekt der *pan*-RNAi vermutlich nicht durch eine Störung der Differenzierung in FC-artige und FCM-artige Myoblasten zustande kommt. Hingegen wäre es möglich, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges zur Induktion der Myoblastenfusion führt.

#### 4.3.6 DWnt2 steuert die Determination der Testismuskeln

Die bisher durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass der kanonische Wnt Signalweg in Testes-relevanten Myoblasten bzw. Myotuben aktiv ist. Durch knock-downs einiger kanonischer Wnt Komponenten konnten sowohl schwache Migrationsdefekte als auch Fusionsdefekte beobachtet werden. Um herauszufinden, woher das Signal kommt, also welches Gewebe bzw. Organ den oder die entsprechenden Wnt Liganden sekretiert, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden RT-PCRs an RNA aus ganzen Testes unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte gemacht. Transkripte von *wingless*, *DWnt2*, *DWnt4* und *DWnt6* konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten in pupalen Testes nachgewiesen werden, während für *DWnt10* kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte (Tab. 5).

**Tabelle 5:** Übersicht der RT-PCRs der Wnt Liganden

<b>Wnt Liganden</b>					
<b>Gen</b>	<b>8 h APF</b>	<b>16 h APF</b>	<b>24 h APF</b>	<b>26 h APF</b>	<b>30 h APF</b>
<i>wingless</i>	+	+	+	+	+
<i>DWnt2</i>	+	+	+	+	+
<i>DWnt3</i>	n.d.	+ *	+ *	n.d.	n.d.
<i>DWnt4</i>	+	+	+	+	+
<i>DWnt6</i>	+	+	+	+	+
<i>DWnt10</i>	?	?	?	?	?
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>sgs5</i> (neg.)	-	-	-	-	-

+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; \* = an mRNA getestet; n.d. = nicht durchgeführt; ? = nicht eindeutig; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Für funktionelle Analysen wurden die Wnt Liganden *DWnt2* und *DWnt4* untersucht, da diese Liganden bereits im Zusammenhang mit der Besiedlung des Testis mit Myotuben beschrieben wurden (Kozopas et al., 1998). Hierzu wurden in Ermangelung spezifischerer Treiber die Linien C855a-Gal4, Mef2-Gal4 oder UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 verwendet. Die



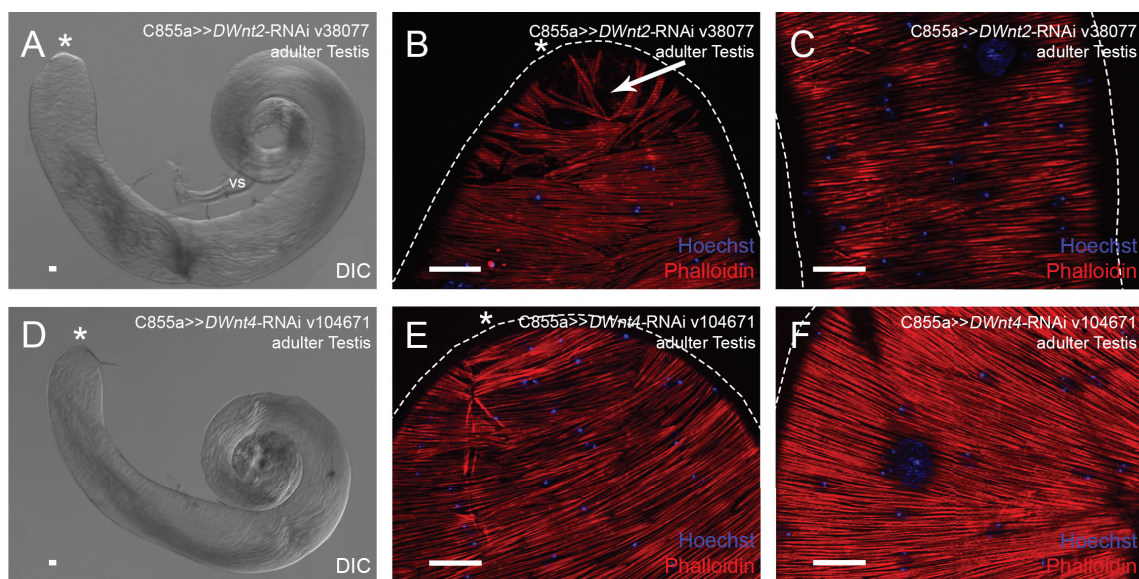
adulten Reproduktionsorgane der resultierenden  $F_1$ -Generationen wurden analysiert, ebenso wurde die Fertilität ermittelt. Die Ergebnisse des RNAi-vermittelten knock-down sind in Tabelle 6 aufgelistet. Exemplarisch werden hier C855a-getriebene *DWnt2*- und *DWnt4*-RNAi gezeigt, ein Teil der restlichen Kreuzungen mit der UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4-Treiberlinie befindet sich im Anhang (Abb. A19-A20).

**Tabelle 6:** Übersicht der RNAi-vermittelten Herunterregulation von *DWnt2* und *DWnt4*

Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Reproduktionsorgane	Fertilität
C855a>> <i>DWnt2</i> -RNAi v38077*	Mu – TE: schwache Defekte in der Hubregion; Rest wt Mo – wt	89 %
Mef2>> <i>DWnt2</i> -RNAi v38077	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>>Dcr-2;; <i>DWnt2</i> -RNAi v38077**	Mu – wt Mo – DE: z.T. Löcher; Rest wt	100 %
C855a>> <i>DWnt2</i> -RNAi v104338	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>DWnt2</i> -RNAi v104338	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>>Dcr-2; <i>DWnt2</i> -RNAi v104338	Mu – wt Mo – TE: dünn; DE, PG: klein und dick; Rest wt	n.d. <sup>1</sup>
C855a>> <i>DWnt4</i> -RNAi v38010	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>DWnt4</i> -RNAi v38010	Mu – TE, DE, PG: misorientierte, übereinander laufende Muskeln; Rest wt Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; PG: klein und dick; Rest wt	79 %
Mef2>>Dcr-2; <i>DWnt4</i> -RNAi v38010	Mu – TE, DE, PG: misorientierte, übereinander laufende Muskeln; Rest wt Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; Rest wt	90 %
C855a>> <i>DWnt4</i> -RNAi v104671*	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>DWnt4</i> -RNAi v104671	Mu – TE, PG: misorientierte, übereinander laufende Muskeln; Rest wt Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; Rest wt	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2; <i>DWnt4</i> -RNAi v104671**	Mu – TE, VS, DE, PG: misorientierte, übereinander laufende Muskeln; SP: schmale Muskeln Mo – TE: nicht gerollt, Windungen in verschiedene Richtungen; Rest klein	n.d. <sup>1</sup>

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; TE = Testis; VS = Seminal Vesicle; DE = Ductus ejaculatus; PG = Paragonium; SP = Spermenpumpe; wt = wildtypisch; n.d. = nicht durchgeführt; <sup>1</sup> pharat letal; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang

Die Treiberlinie C855a-Gal4 wurde für die Herunterregulation von *DWnt2* und *DWnt4* verwendet, da sie die Expression in der Testishülle treibt. Die spezifische Herunterregulation von *DWnt2* resultierte in morphologisch wildtypischen adulten Testes (Abb. 16 A). Die Testismuskulatur wies einige kleine Löcher in der Hubregion auf (Abb. 16 B, Pfeil), war abgesehen davon allerdings wildtypisch (Abb. 16 C). Die männliche Fertilität dieser Tiere war annähernd wildtypisch (89%, Tab. 6, Abb. A20). Die Herunterregulation von *DWnt4* in der Testishülle brachte adulte Testes hervor, die sowohl morphologisch (Abb. 16 D) sowie in der Muskelschicht (Abb. 16 E-F) wildtypisch aussah. Diese Tiere waren fertil (100%, Tab. 6, Abb. A21).



**Abbildung 16: Die Herunterregulation von *DWnt2* in der Testishülle bewirkt leichte Defekte in der Testismuskulatur.** Analyse von adulten C855a>>*DWnt2*-RNAi bzw. C855a>>*DWnt4*-RNAi exprimierenden Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Bei der Herunterregulation von *DWnt2* ist der Testis morphologisch wildtypisch (A), die Muskulatur ist bis auf kleine Löcher (Pfeil) in der Hubregion (B) ebenfalls wildtypisch (C). Die Herunterregulation von *DWnt4* resultiert in morphologisch normalen Testes (D) mit wildtypischer Muskulatur (E-F). Sternchen markieren die Hubregionen, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Da beim Einsatz der C855a-Gal4 Treiberlinie nur sehr leichte Defekte in der Testismuskulatur nach Herunterregulation von *DWnt2* beobachtet werden konnten und kein anderer geeigneter Treiber verfügbar war, wurden funktionsbeeinträchtigte *DWnt2*- und *DWnt4*-Allele (Kozopas et al., 1998) bezüglich Defekten in der Testismuskulatur untersucht. Hierzu wurden adulte Testes aus Männchen dieser Linien analysiert. Zusätzlich wurden die zwei amorphen Allele *DWnt2<sup>L</sup>* und *DWnt2<sup>O</sup>* *in trans* gekreuzt sowie *DWnt2* mithilfe von C855a-Gal4 ektopisch exprimiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Exemplarisch werden die beiden Kreuzungen weiter analysiert.

**Tabelle 7:** Phänotypen verschiedener *DWnt2*- und *DWnt4*-Allele

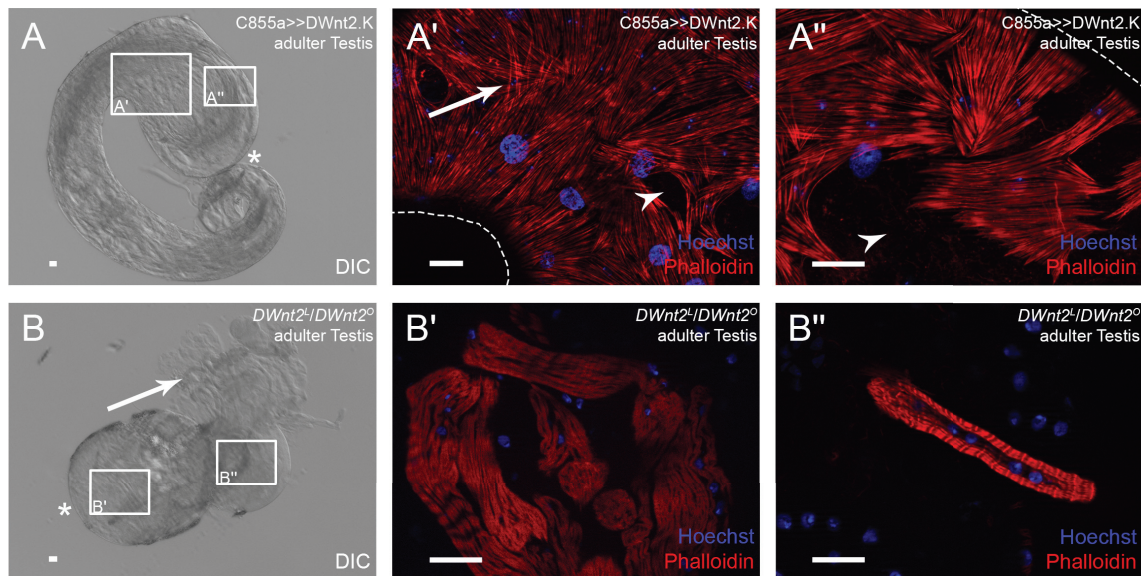
Fliegenlinie, Art des Allels / Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Testis
<i>DWnt2<sup>I</sup></i> amorphes Allel, temperatursensitives loss of function Allel (BL6960)	Mu – wt Mo – wt
<i>DWnt2<sup>L</sup></i> amorphes Allel (BL6909)	Mu – wt Mo – wt
<i>DWnt2<sup>O</sup></i> loss of function Allel, amorphes Allel (BL6958)	Mu – einige misorientierte Muskeln Mo – wt
<i>DWnt2<sup>RJ</sup></i> temperatursensitives hypomorphes Allel (BL6959)	Mu – wt Mo – wt
<i>DWnt4<sup>C1</sup></i> , Röntgenstrahl-Mutagenese von <i>DWnt4</i> (BL6651)	Mu – wt Mo – wt
<i>DWnt2<sup>L</sup></i> , <i>DWnt4<sup>C1</sup></i> (BL6907)	Mu – wt Mo – wt
C855a>> <i>DWnt2.K</i> , Transgen für ektopische Expression BL6961*	Mu – misorientierte, übereinander laufende Muskeln, Hubregion z.T. frei von Muskeln Mo – verdickte Spitze, weitere Verdickungen
<i>DWnt2<sup>L</sup>/DWnt2<sup>O</sup>*</i>	Mu – variabel, z.T. fehlt glatte Muskulatur, nur vereinzelt gestreifte Muskeln Mo – variabel, z.T. klein und rund, nicht elongiert

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; wt = wildtypisch; \* = wird näher charakterisiert

Die C855a-getriebene ektopische Expression von *DWnt2.K* resultierte in Tieren, die pharat lethal waren. Die adulten Testes waren nicht richtig aufgerollt und wiesen eine verdickte Spitze sowie weitere Verdickungen auf (Abb. 17 A). Die Testismuskeln waren teilweise misorientiert, sie verliefen übereinander (Abb. 17 A', Pfeil) und wiesen Löcher auf (Abb. 17 A'', Pfeilkopf). Teilweise war die Hubregion nicht mit Muskeln bedeckt (Abb. 17 A'', Pfeilkopf). Die Kreuzung der Allele *DWnt2<sup>L</sup>* und *DWnt2<sup>O</sup>* *in trans* führte ebenfalls zu pharat lethalen Tieren. Die Morphologie der Testes war sehr variabel, wie bereits in Linne-mannstöns et al. (2014) beschrieben wurde. Der häufigste Phänotyp bestand aus kleinen, deformierten Testes, die nicht elongiert waren (Abb. 17 B). Die Stabilität der Testes war offensichtlich vermindert, sodass Keimzellen austraten (Abb. 17 B, Pfeil). Die Testishülle beinhaltet keine glatten Muskeln, aber F-Aktin-reiche Strukturen waren detektierbar, die wie mehrkernige, gestreifte Muskeln aussahen (Abb. 17 B'-B'').

Die Ergebnisse der Analysen des kanonischen Wnt Signalweges suggerieren, dass der Signalweg in Testes-relevanten Myotuben auf der Genitalscheibe aktiv zu sein scheint, der entsprechende Rezeptor könnte Fz2 sein. Die funktionellen Analysen mithilfe von RNAi-Experimenten erbringen widersprüchliche Ergebnisse.





**Abbildung 17: DWnt2 ist eine Komponente in der Determination der Testismuskeln.** Analyse von adulten C855a>>DWnt2.K bzw. *DWnt2<sup>L</sup>/DWnt2<sup>O</sup>* exprimierenden Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die ektopische Expression von DWnt2.K führt zu adulten Testes, die nicht richtig gerollt sind und eine stark verdickte Testisspitze aufweisen (A). Einige Testismuskeln sind misorientiert (Pfeil) und Löcher in der Muskulatur sind erkennbar (Pfeilkopf) (A'). Die Hubregion weist keine Muskeln auf (Pfeilkopf) (A''). *DWnt2<sup>L</sup>/DWnt2<sup>O</sup>* exprimierende adulte Testes sind nicht elongiert, Spermienbündel treten aus (Pfeil) (B). Die Testishülle beinhaltet einige gestreifte Muskeln (B'-B''). Sternchen markieren die Hubregionen, Kästen kennzeichnen die vergrößerten Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Sie deuten teilweise auf eine Beteiligung an der Migration der Testes-Myotuben hin, teilweise auf die korrekte Ausrichtung der Muskeln des Reproduktionstraktes. Die Untersuchung der *DWnt2* Allele hingegen deutet darauf hin, dass der kanonische Wnt Signalweg essentiell für die korrekte Determination der Testes-relevanten Myoblasten ist, da die *DWnt2<sup>L</sup>/DWnt2<sup>O</sup>* dazu führte, dass gestreifte statt glatter Muskeln auf adulten Testes zu finden waren. Die gestörte Migration der Testes-Myotuben wäre dabei nur ein sekundärer Effekt.

#### 4.4 Analysen der nicht-kanonischen Wnt Signalwege hinsichtlich einer Beteiligung an der Migration von Testes-Myotuben

Neben dem bereits untersuchten kanonischen Wnt Signalweg sind nicht-kanonische „planar cell polarity“ (PCP) Wnt Signalwege bekannt (Simons and Mlodzik, 2008). Diese Signalwege steuern die Zellpolarität und sind in mehreren Zellmigrationsprozessen beschrieben (Muñoz-Soriano et al., 2012). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die PCP Signalwege im Hinblick auf die Migration der Testes-Myotuben untersucht.

##### 4.4.1 Transkripte der Komponenten beider PCP Signalwege sind in Testes-relevanten Myoblasten detektierbar

Innerhalb der PCP Signalwege werden zwei Module voneinander unterschieden, das globale Modul (auch Fat/Dachsous System genannt) sowie das Kernmodul (Muñoz-Soriano et al., 2012; Simons and Mlodzik, 2008). Um herauszufinden, ob einer der beiden PCP Sig-

nalwege an der Migration der Testes-Myotuben beteiligt sein könnte, wurde mit der Analyse der Transkription in Testes-relevanten Myoblasten begonnen. Mithilfe von RT-PCRs konnten für das globale Modul Transkripte von *fat* und *dachsous* in Genitalscheiben-Myoblasten von 16 h APF bis 30 h APF nachgewiesen werden, für den transkriptionellen Repressor Grunge konnten keine Ergebnisse erzielt werden (Tab. 8).

**Tabelle 8:** Übersicht der RT-PCRs für das globale PCP Modul

<b>Komponenten globales PCP Modul</b>					
<b>Gen</b>	<b>8 h APF</b>	<b>16 h APF</b>	<b>24 h APF</b>	<b>26 h APF</b>	<b>30 h APF</b>
<i>fat</i>	-	+	+	+	+
<i>dachsous</i>	-	+	+	+	+
<i>grunge</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl<sup>P4D</sup></i> (neg.)	-	-	-	-	-

+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; n.d. = nicht erfolgreich durchgeführt; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Einige Komponenten des PCP Kernmoduls wurden ebenfalls mittels RT-PCR überprüft. Hierbei konnten Transkripte von *Van Gogh* und *diego* in Myoblasten von 16 h APF bis 30 h APF, *prickle* bei 16 h APF und 26 h APF und *starry night* von 16 h APF bis 26 h APF detektiert werden (Tab. 9).

**Tabelle 9:** Übersicht der RT-PCRs für das PCP Kernmodul

<b>Komponenten PCP Kernmodul</b>					
<b>Gen</b>	<b>8 h APF</b>	<b>16 h APF</b>	<b>24 h APF</b>	<b>26 h APF</b>	<b>30 h APF</b>
<i>starry night</i>	-	+	+	+	n.d.
<i>Van Gogh</i>	-	+	+	+	+
<i>prickle</i>	-	+	-	+	-
<i>diego</i>	-	+	+	+	+
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl<sup>P4D</sup></i> (neg.)	-	-	-	-	-

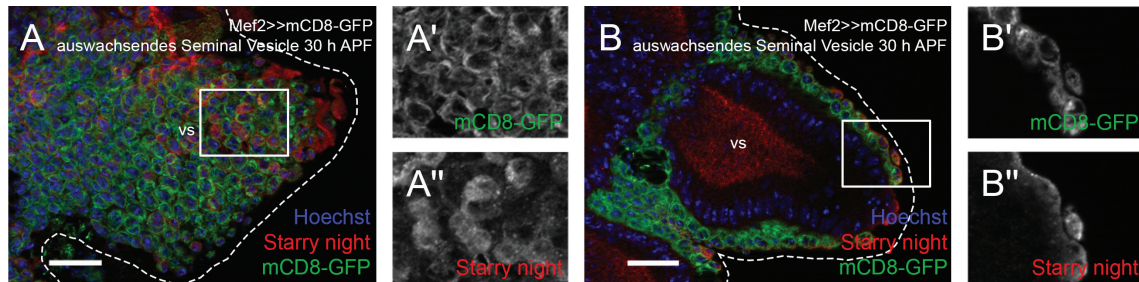
+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; n.d. = nicht erfolgreich durchgeführt; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Da das PCP Kernmodul an der „border cell“ Migration in Ovarien von *Drosophila melanogaster* beteiligt ist (Bastock and Strutt, 2007) und passende Antikörper sowie RNAi-Linien nur für Komponenten dieses Signalweges verfügbar waren, wurden weitere Analysen der PCP Signalwege auf das Kernmodul beschränkt.

#### 4.4.2 Das PCP Kernmodul ist vermutlich nicht an der Migration der Testes-Myotuben beteiligt

Um zusätzlich zur Transkription auch die Expression von PCP Kernmodul-Kompo-

nenten in Testes-relevanten Myoblasten nachweisen zu können, wurden Immunfluoreszenz Analysen an *Mef2>>mCD8-GFP* exprimierenden Genitalscheiben durchgeführt. Der einzige verfügbare Antikörper war einer gegen Starry night (Stan). Der Antikörper detektierte das Protein in Testes-relevanten Myoblasten und naszierenden Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles 30 h APF (Abb. 18 A-B“). Zusätzlich war Stan im Lumen des Seminal Vesicles detektierbar (Abb. 18 B).



**Abbildung 18: Starry night ist in Testes-relevanten Myoblasten detektierbar.** Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben. Myoblasten sowie naszierende Myotuben sind durch *Mef2>>mCD8-GFP* markiert, die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt. Der Antikörper detektiert Stan im Cytoplasma von Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) 30 h APF (A-B“). Auch im darunterliegenden Epithel lässt sich Stan nachweisen (B). A stellt die Aufsicht auf das auswachsende Seminal Vesicle dar, B die Schnittebene. Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Für funktionelle Analysen wurden die Komponenten Van Gogh (Vang), Prickle (pk) und Diego (dgo) untersucht. Hierzu wurde die Treiberlinie *UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4* verwendet. Die adulten Reproduktionsorgane der resultierenden  $F_1$ -Generationen wurden analysiert, ebenso wurde die Fertilität ermittelt. Die Ergebnisse der RNAi-vermittelten Herunterregulationen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Exemplarisch werden die Ergebnisse für *pk* gezeigt, ein Teil der restlichen Kreuzungen befindet sich im Anhang (Abb. A22-A23).

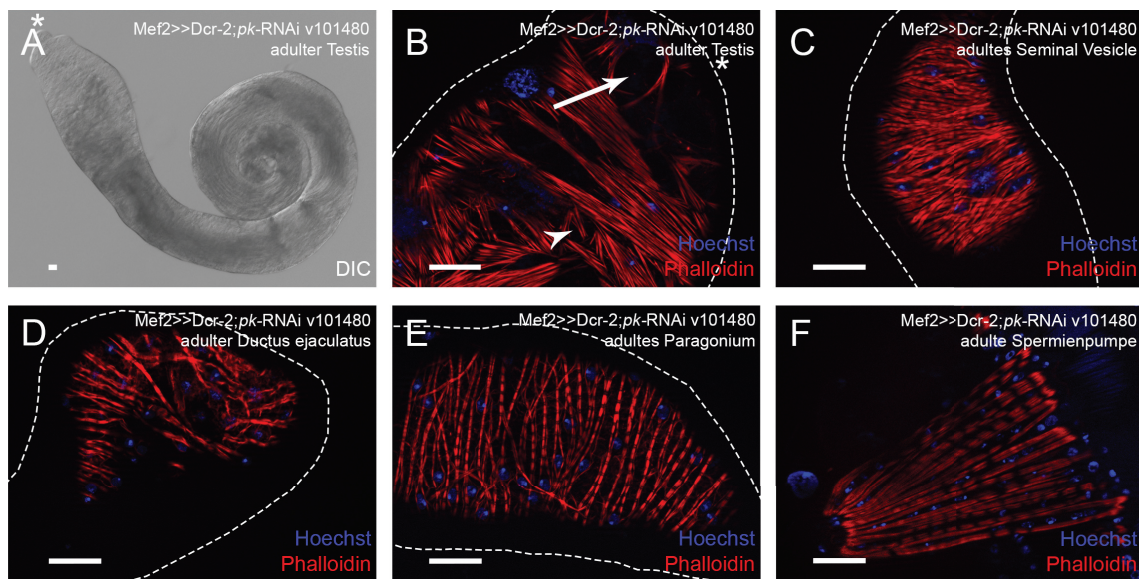
**Tabelle 10:** Übersicht muskelspezifischer knock-downs von PCP Kernmodul-Komponenten

Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Reproduktionsorgane	Fertilität
<i>Mef2&gt;&gt;Dcr-2;Vang-RNAi v7376**</i>	Mu – DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – wt	100 %
<i>Mef2&gt;&gt;Dcr-2;pk-RNAi v101480*</i>	Mu – TE, DE: misorientierte Muskeln, Löcher; PG: misorientierte Muskeln; Rest wt Mo – wt	n.d. <sup>1</sup>
<i>Mef2&gt;&gt;Dcr-2;;dgo-RNAi BL35040</i>	Mu – wt Mo – wt	100 %
<i>Mef2&gt;&gt;Dcr-2;dgo-RNAi v108410</i>	Mu – TE: z.T. Löcher, Rest wt Mo – wt	n.d. <sup>1</sup>

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; TE = Testis; VS = Seminal Vesicle; DE = Ductus ejaculatorius; PG = Paragonium; SP = Spermienpumpe; wt = wildtypisch; n.d. = nicht durchgeführt; <sup>1</sup> pharat letal; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang



Der muskelspezifische knock-down von *pk* mithilfe von *Mef2>>Dcr-2* resultierte in morphologisch wildtypischen Testes (Abb. 19 A). Allerdings wies die Testismuskulatur in der Hubregion einige Löcher (Abb. 19 B, Pfeil) und viele misorientierte Muskeln auf (Abb. 19 B, Pfeilkopf). Die Muskulatur der Seminal Vesicles erschien wildtypisch (Abb. 19 C), die Muskeln des Ductus ejaculatus hingegen offenbarten Löcher in der Muskelschicht (Abb. 19 D). Einige misorientierte Muskeln waren ebenfalls im Ductus ejaculatus (Abb. 19 D) sowie in den Paragonien zu sehen (Abb. 19 E). Die Muskeln der Spermienpumpe waren mit dem Wildtyp vergleichbar (Abb. 19 F). Die Fertilität dieser Tiere war nicht vermindert (100%, Tab. 10, Abb. A24).



**Abbildung 19: Die Herunterregulation von *prickle* in Muskeln ruft Defekte in der Testismuskulatur hervor.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;pk-RNAi v101480* exprimierenden adulten Reproduktionssystemen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Der Testis ist morphologisch normal (A). Die Testismuskulatur weist Löcher (Pfeil) sowie misorientierte Muskeln (Pfeilkopf) auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles sind wildtypisch (C), der Ductus ejaculatus weist Löcher in der Muskulatur auf (D). Misorientierte Muskeln sind im Ductus ejaculatus (D) sowie den Paragonien (E) zu finden. Die Spermienpumpe besitzt wildtypische Muskeln (F). Sternchen markieren die Hubregionen, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der RNAi-Experimente nicht darauf hin, dass das PCP Kernmodul an der Migration der Testes-Myotuben beteiligt ist.

#### 4.5 Analyse der Focal adhesion kinase bezüglich einer Relevanz in der Migration von Testes-Myotuben

##### 4.5.1 Die Kinase Fak ist in naszierenden Testes-Myotuben transkribiert

Der GFP-Trap von Fak zeigte eine ubiquitäre Expression auf Genitalscheiben 30 h APF (siehe Tab. A1). Da Fak in Mäusen kollektive Zellmigration kontrollieren kann (Serrels et al., 2011), wurde die Kinase dennoch weiter untersucht. Um herauszufinden, ob *Fak* in Myoblas-

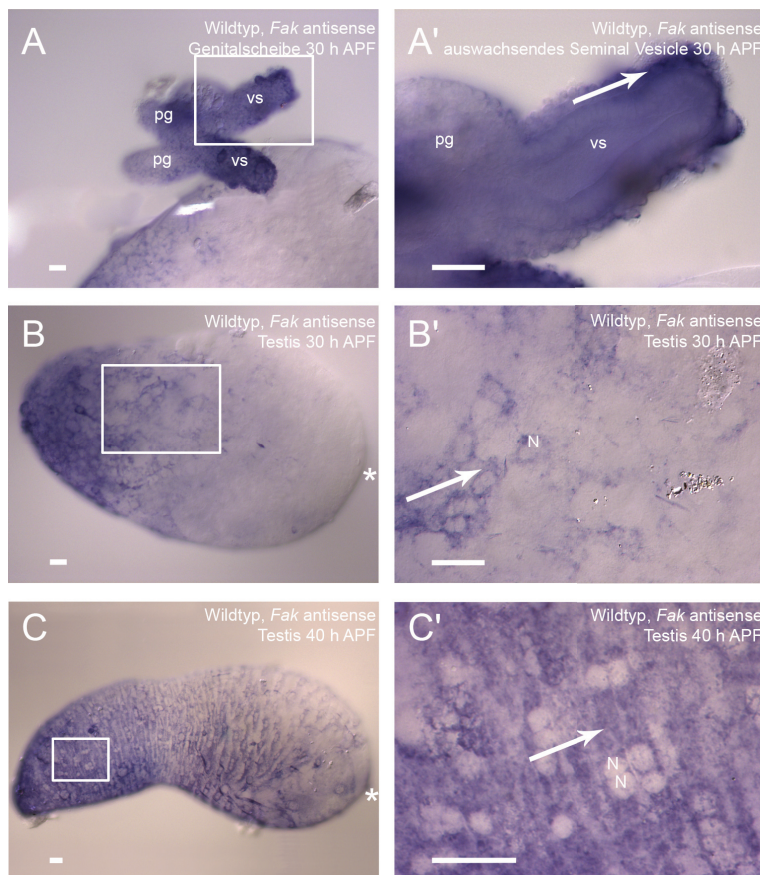
ten auf der Genitalscheibe transkribiert wird, wurden RT-PCRs durchgeführt. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus dem Gesamt-Pool der Myoblasten von Genitalscheiben unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte eingesetzt. Für die Überprüfung wurden zwei Primerpaare verwendet, wobei das eine alle Isoformen von *Fak* detektierte und das andere nur Isoform B. Die Ergebnisse für beide Primerpaare waren identisch, Transkripte von *Fak* ließen sich zwischen 8 h APF und 30 h APF in Myoblasten und Myotuben nachweisen (Tab. 11).

**Tabelle 11:** Übersicht der RT-PCRs von *Fak*

Gen	8 h APF	16 h APF	24 h APF	26 h APF	30 h APF
<i>Fak</i> , alle Isoformen	+	+	+	+	+
<i>Fak</i> , Isoform B	+	+	+	+	+
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl<sup>94D</sup></i> (neg.)	-	-	-	-	-

+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Um die Transkriptverteilung zu analysieren sowie herauszufinden, ob *Fak* auch in naszierenden Myotuben transkribiert wird, die bereits auf die Testes gewandert sind, wurden *in situ* Hybridisierungen an Genitalscheiben und Testes 30 h APF sowie Testes 40 h APF durchgeführt. Im vorderen Teil einer Genitalscheibe 30 h APF detektierte die antisense-Sonde Transkripte (Abb. 20 A), welche deutlich in Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles zu sehen waren (Abb. 20 A', Pfeil).



**Abbildung 20: Transkripte von *Fak* lassen sich in naszierenden Testes-Myotuben detektieren.** *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Genitalscheiben und Testes mithilfe einer *Fak* antisense-Sonde. Der vordere Teil einer Genitalscheibe 30 h APF weist Signale auf (A), die in Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) lokalisieren (Pfeil) (A'). In der Testishülle bei 30 h APF (B, B') und 40 h APF (C, C') sind *Fak* Transkripte detektierbar. In beiden Fällen sind die Signale im Cytoplasma der naszierenden Myotuben (Pfeile) (B', C'), die Zellkerne (Nuklei, N) bleiben frei. Sternchen markieren die Hubregionen, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Maßstabsbalken: 20 µm.

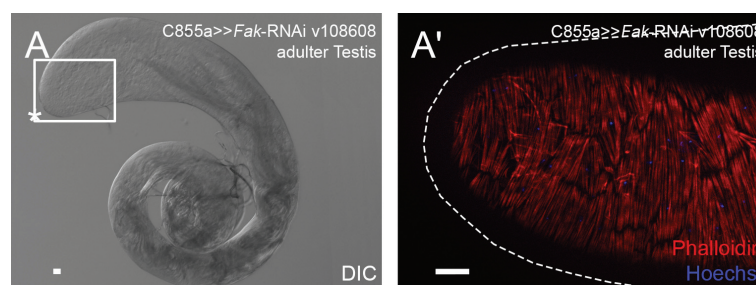
Auf pupalen Testes 30 h APF wurden am basalen Ende Transkripte in der Hülle detektiert (Abb. 20 B). Die Vergrößerung zeigte diese Transkripte im Cytoplasma naszierender Myotuben (Abb. 20 B', Pfeil). Bei 40 h APF konnte mRNA in einem großen Teil der Testishülle detektiert werden (Abb. 20 C), nur die Hubregion blieb frei (Abb. 20 C, Sternchen). Ebenso wie bei 30 h APF waren die Transkripte im Cytoplasma der naszierenden Myotuben auf dem Testis angereichert (Abb. 20 C', Pfeil).

Die Ergebnisse der RT-PCRs sowie der *in situ* Hybridisierungen implizieren, dass *Fak* in Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert wird. Der Nachweis von Transkripten in Myoblasten und Myotuben von 8 h APF bis mindestens 40 h APF deutet darauf hin, dass *Fak* während der Migration der naszierenden Myotuben auf den Testis exprimiert wird. Weitere Analysen bezogen sich dementsprechend auf die putative Rolle von *Fak* während dieses Migrationsprozesses.

#### 4.5.2 Die Reduktion von *Fak* in der Testishülle stört nicht die Migration von Testes-Myotuben

Um zu analysieren, ob *Fak* eine Rolle während der Migration von Testes-Myotuben spielt, wurde ein RNAi-vermittelter knock-down mit der Treiberlinie C855a-Gal4 durchgeführt. Tiere der resultierenden F<sub>1</sub>-Generation waren größtenteils pharat letal, wobei jedoch ca. 10% aus den Puppenhüllen schlüpfen konnten. Aus beiden Gruppen wurden adulte Testes herauspräpariert und analysiert. Die Morphologie der Testes war nahezu wildtypisch (Abb. 21 A), die mittels Phalloidin und Hoechst angefärbte Muskelschicht wies keine Defekte auf (Abb. 21 A').

Die Fertilität der geschlüpften Männchen, in denen *Fak* mithilfe von C855a-Gal4 herunterreguliert war, war nicht vermindert gegenüber den Kontrollen (100%, Abb. A25). Die Herunterregulation von *Fak* in der Testishülle deutet nicht darauf hin, dass *Fak* bei der Migration naszierender Myotuben auf die Testes eine Rolle spielt.



**Abbildung 21: Der knock-down von *Fak* in der Testishülle führt nicht zu Defekten.** Analyse von adulten C855a>>*Fak*-RNAi exprimierenden Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie (A) sowie die glatte Muskelschicht der Testes (A') erinnert an den Wildtyp. Das Sternchen markiert die Hubregion, der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



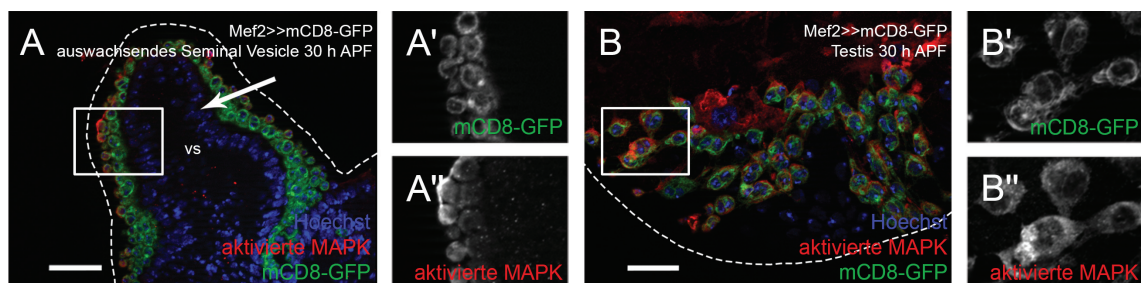
Um herausfinden zu können, ob Fak doch eine Funktion in naszierenden Testes-Myotuben während der Wanderung einnimmt, sollte die vorhandene *Fak*-RNAi-Linie mit Mef2-Gal4 oder einer Testismuskel-spezifischen Treiberlinie getrieben und auf Defekte hin untersucht werden. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers (Nagaosa et al., 2011) könnte zudem die endogene Expression von Fak bestimmt werden sowie die Funktionalität der RNAi-Linie überprüft werden. Erst diese Analysen würden zuverlässige Aussagen über eine Beteiligung von Fak an der Migration der Testes-Myotuben zulassen.

#### 4.6 Untersuchungen des MAP Kinase-Weges bezüglich der Migration von Testes-Myotuben

Signalwege, die von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) abhängen, wie beispielsweise der FGF oder der EGF Signalweg, sind an vielen Migrationsprozessen beteiligt (Huang et al., 2004; Muha and Müller, 2013). Daher wären diese Signalwege potentielle Kandidaten für die Migration der naszierenden Testes-Myotuben. RTKs können bei Aktivierung MAPK Kaskaden ansteuern, wobei drei Gruppen von MAPKs unterschieden werden: die MAPK Erk, p38 und JNK (Huang et al., 2004; Johnson und Lapadat, 2002).

##### 4.6.1 Der MAP Kinase-Weg ist in naszierenden Testes-Myotuben während der Migration aktiviert

Um zu untersuchen, ob RTK Signalwege in Testes-Myotuben aktiviert sind, wurden Immunfluoreszenz Analysen mithilfe eines Antikörpers gegen die phosphorylierte Form der MAPK Erk (aktivierte MAPK) durchgeführt. Dieser Antikörper wird häufig genutzt, um die Aktivierung von RTK Signalwegen zu detektieren (Gabay et al., 1997; Lyulcheva et al., 2008). Auf Mef2>>mCD8-GFP exprimierenden Genitalscheiben bei 30 h APF detektierte der Antikörper aktivierte MAPK Erk in Testes-relevanten Myoblasten auf dem auswachsenden Seminal Vesicle (Abb. 22 A-A“).



**Abbildung 22: Aktivierte MAPK Erk ist in Testes-relevanten Myoblasten und naszierenden Myotuben nachweisbar.** Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben und pupalen Testes. Myoblasten sowie naszierende Myotuben sind durch Mef2>>mCD8-GFP markiert, die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt. Der Antikörper detektiert aktivierte MAPK Erk im Cytoplasma von Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) 30 h APF (A-A“). Im darunterliegenden Epithel (Pfeil) lässt sich keine aktivierte MAPK nachweisen (A). Auf pupalen Testes 30 h APF ist aktivierte MAPK Erk ebenfalls im Cytoplasma naszierender Myotuben detektierbar (B-B“). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



Das Signal war am stärksten in den außen liegenden Myoblasten (Abb. 22 A-A“), das darunterliegende Epithel wies keine aktivierte MAPK auf (Abb. 22 A, Pfeil). In naszierenden Myotuben auf Testes bei 30 h APF konnte ebenfalls aktivierte MAPK Erk im Cytoplasma detektiert werden (Abb. 22 B-B“).

Die Immunfluoreszenz Analysen geben Hinweise darauf, dass der Erk-MAPK-Weg und somit eine RTK Signalkette in naszierenden Myotuben während der Migration auf die Testes aktiviert ist.

#### 4.6.2 Die MAPKKKK Misshapen ist essentiell für die korrekte Migration der Testes-Myotuben

Die Proteinkinase Misshapen (Msn) besitzt MAPKKKK Aktivität und beeinflusst die Migration von Follikelzellen in Ovarien von *Drosophila* (Lewellyn et al., 2013). Daher wurde Msn bezüglich einer Relevanz in der Myotuben-Migration untersucht. Um herauszufinden, ob *msn* in Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert wird, wurden RT-PCRs an Gesamt-RNA aus Genitalscheiben-Myoblasten durchgeführt. Transkripte von *msn* ließen sich zwischen 8 h APF und 30 h APF in den Myoblasten nachweisen (Tab. 12).

**Tabelle 12:** Übersicht der RT-PCRs von *msn*

Gen	8 h APF	16 h APF	24 h APF	26 h APF	30 h APF
<i>misshapen</i>	+	+	+	+	+
<i>alpha-tubulin</i> (pos.)	+	+	+	+	+
<i>tpl<sup>P4D</sup></i> (neg.)	-	-	-	-	-

+ = Transkript da; - = Transkript nicht da; pos. = Positivkontrolle; neg. = Negativkontrolle

Für funktionelle Analysen wurde *msn* RNAi-vermittelt herunterreguliert. Hierzu wurden die Treiberlinien Mef2-Gal4 und UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 verwendet. Die adulten Reproduktionsorgane der resultierenden F<sub>1</sub>-Generationen wurden analysiert, ebenso wurde die Fertilität ermittelt. Die Ergebnisse der muskelspezifischen *msn*-knock-downs sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13:** Übersicht der RNAi-vermittelten Herunterregulation von *msn*

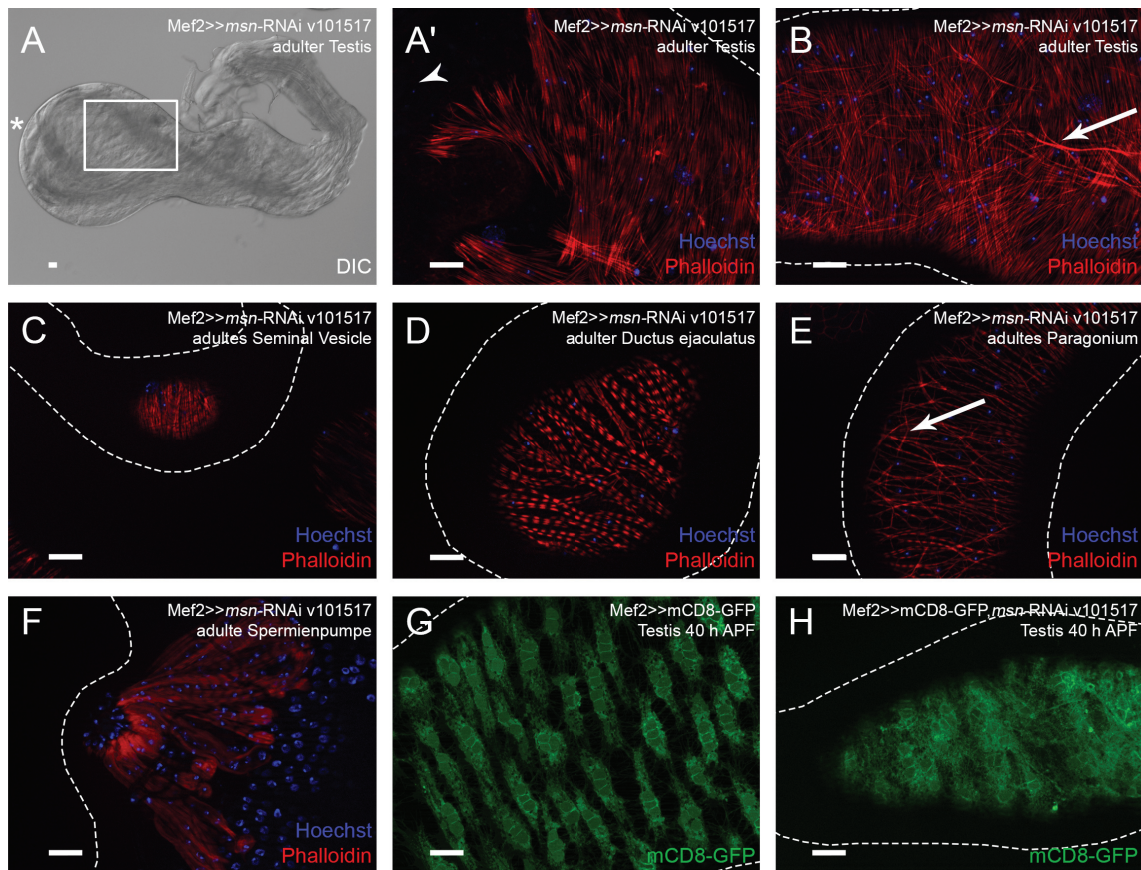
Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Reproduktionsorgane	Fertilität
Mef2>> <i>msn</i> -RNAi BL28791	Mu – variabel, TE: z.T. keine glatte Muskulatur, nur vereinzelt gestreifte Muskeln, z.T. misorientierte Muskeln, keine Muskeln in der Hubregion; DE: z.T. Löcher; Rest wt Mo – variabel, TE: z.T. klein, rund, aber verbunden zum Seminal Vesicle, z.T. elongiert mit stark verdickter Testispitze; Rest wt	17 %

Mef2>>Dcr-2;; <i>msn</i> -RNAi BL28791	Mu – variabel, TE: z.T. keine glatte Muskulatur, nur vereinzelt gestreifte Muskeln, z.T. misorientierte Muskeln, keine Muskeln in der Hubregion; Rest wt	100 %
	Mo – TE: stark verdickte Testisspitze, viele weitere Verdickungen, nicht richtig aufgerollt	
Mef2>> <i>msn</i> -RNAi v101517*	Mu – TE: misorientierte Muskeln, keine Muskeln in der Hubregion; PG: z.T. misorientierte Muskeln; SP: Muskeln z.T. kürzer, gestörte Form; Rest wt	50 %
	Mo – TE: verdickte Testisspitze, viele weitere Verdickungen, nicht richtig aufgerollt; Rest wt	
Mef2>>Dcr-2;; <i>msn</i> -RNAi v101517**	Mu – TE: misorientierte Muskeln, keine Muskeln in der Hubregion; SP: falsch angeordneter Muskel; Rest wt	65 %
	Mo – TE: z.T. stark verdickte Testisspitze, viele weitere Verdickungen, nicht richtig aufgerollt; SP: verdickt; Rest wt	

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; TE = Testis; VS = Seminal Vesicle; DE = Ductus ejaculatus; PG = Paragonium; SP = Spermienpumpe; wt = wildtypisch; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang

Die muskelspezifische Herunterregulation von *msn* mithilfe der Treiberlinie Mef2-Gal4 führte zu morphologischen Defekten der Testes. Die Testes waren nicht richtig gerollt, sondern wiesen nur etwa eine Umdrehung auf, die Testisspitze war stark verdickt (Abb. 23 A). Die Hubregion war nicht von Muskeln bedeckt (Abb. 23 A', Pfeilkopf), übereinanderliegende, misorientierte Muskeln waren entlang des gesamten Testisschlauches erkennbar (Abb. 23 B, Pfeil). Die Muskelschichten um die Seminal Vesicles (Abb. 23 C) sowie den Ductus ejaculatus (Abb. 23 D) erschienen wildtypisch, die Paragonien wiesen einige misorientierte Muskeln auf (Abb. 23 E, Pfeil). Die Muskeln der Spermienpumpe waren teilweise kürzer und wiesen Verkrümmungen auf (Abb. 23 F). Männliche Tiere dieses Genotyps waren vermindert fertil (50%, Tab. 13, Abb. A28). Pupale Testes bei 40 h APF wiesen nach Herunterregulation von *msn* mCD8-GFP-positive naszierende Myotuben auf, doch die Form der Zellen war im Gegensatz zur wildtypischen Situation gestört (Abb. 23 G-H). Mit der Treiberlinie UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 konnten vergleichbare, wenn auch leicht verstärkte Defekte der adulten Reproduktionstrakt-Muskulatur festgestellt werden (Abb. A26-A27).

Zur weiteren Charakterisierung dieses Phänotyps wurden Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben sowie adulten Testes nach muskelspezifischem *msn*-knock-down durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die starken Defekte der Testismuskulatur durch eine veränderte Differenzierung in FC- und FCM-artige Zellen zustande kam, wurde die Präsenz des spezifisch in FC-artigen Myoblasten exprimierten IgSF-Moleküls Duf untersucht. Auf auswachsenden Mef2>>mDC8-GFP,*msn*-RNAi exprimierenden Seminal Vesicles 24 h APF war Duf wie im Wildtyp in FC-artigen Myoblasten exprimiert (Abb. 24 A-A').

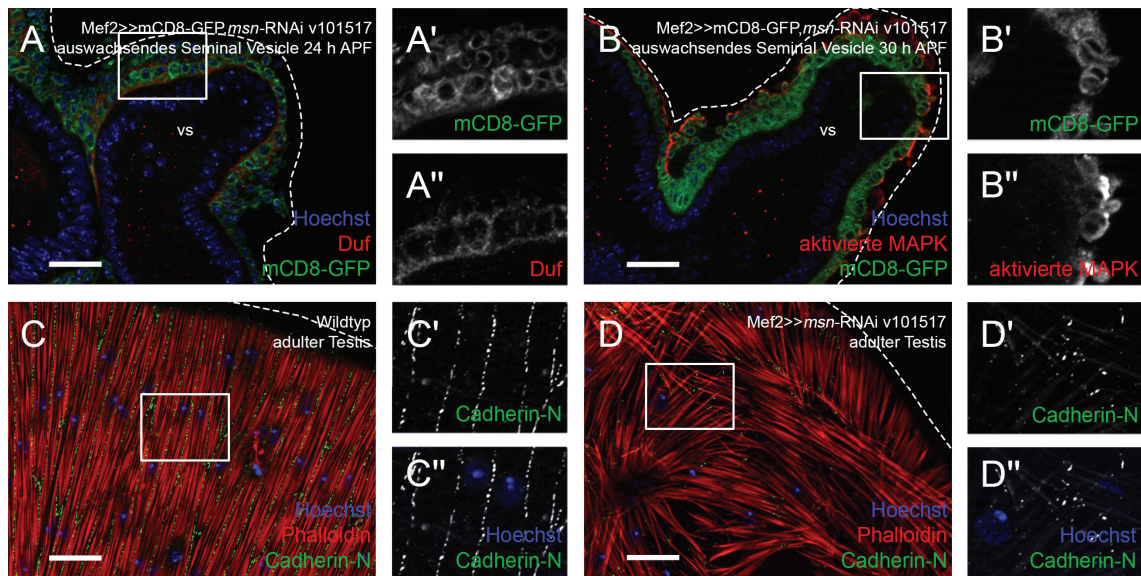


**Abbildung 23: Muskelspezifischer knock-down von *misshapen* resultiert in starken Defekten der Testis-muskulatur.** Analyse von adulten *Mef2>>msn-RNAi v101517* exprimierenden Reproduktionssystemen sowie pupalen Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Testes sind an der Spitze stark vergrößert und nicht richtig aufgerollt (A). Die Hubregion weist keine Muskeln auf (Pfeilkopf) (A'), die gesamte Testis-muskulatur beinhaltet misorientierte Muskeln (Pfeil) (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C) sowie des Ductus ejaculatus (D) erscheinen wildtypisch, die Paragonien weisen teilweise misorientierte Muskeln auf (Pfeil) (E). Die Muskeln der Spermienpumpe sind kürzer und nicht richtig geformt (F). Im Vergleich zu wildtypischen Testes (G) weisen Testes mit muskelspezifisch herunterreguliertem *msn* bei 40 h APF verformte naszierende Myotuben auf (H). Das Sternchen markiert die Hubregion, der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Zur Überprüfung des Status des Erk-MAPK-Weges wurden Genitalscheiben bei 30 h APF untersucht. Der Antikörper gegen aktivierte MAPK Erk detektierte ein Signal in außenliegenden Myotuben obwohl *msn* herunterreguliert war (Abb. 24 B-B'). Da die muskelspezifische Herunterregulation von *msn* zu stark misorientierten und übereinanderliegenden Testis-Muskeln geführt hatte, wurde die Adhäsion zwischen einzelnen Myotuben betrachtet. Hierzu wurde Cadherin-N (CadN) mithilfe eines Antikörpers analysiert, der im Wildtyp die Muskelgrenzen im Testis markiert (Abb. 24 C-C'). In der *msn*-knock-down-Situation war die CadN Expression erheblich vermindert, nur einzelne CadN-positive Punkte waren sichtbar (Abb. 24 D-D').

Die RNAi- und Immunfluoreszenz Analysen bezüglich der MAPK Erk und der MAPKKKK Msn deuten darauf hin, dass der Erk-MAPK- und somit ein RTK-Signalweg während der Migration von naszierenden Myotuben auf den Testes aktiviert ist.





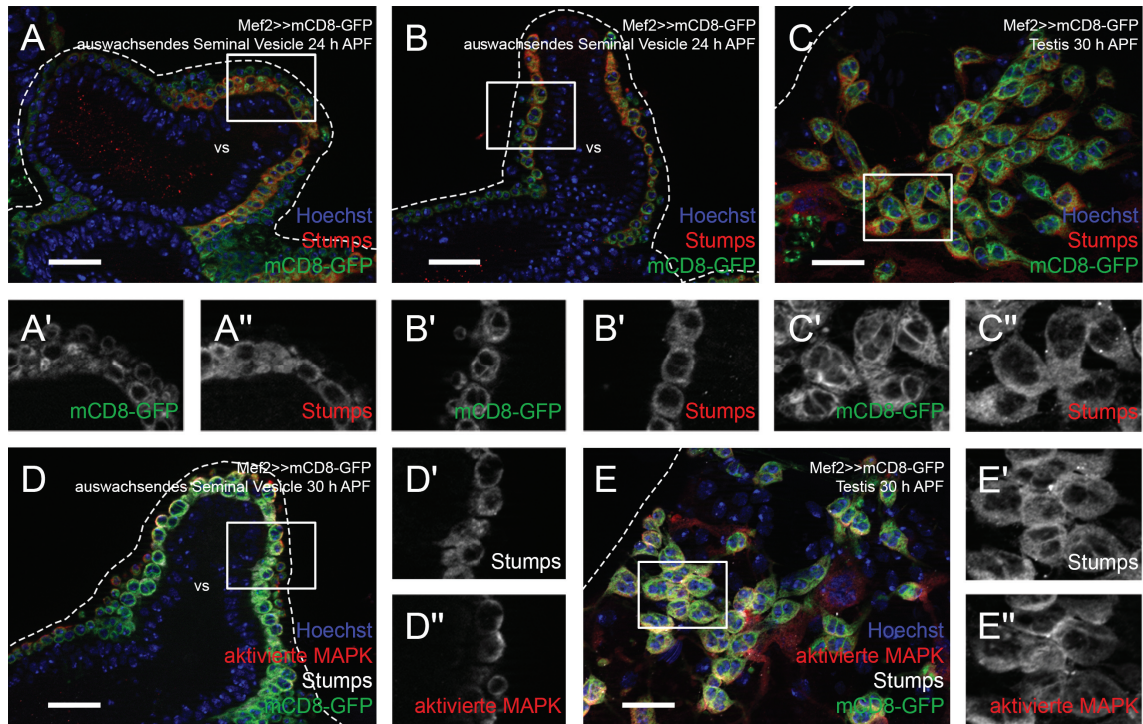
**Abbildung 24: Der muskelspezifische *misshapen*-knock-down verändert die Expression von Cadherin-N.** Immunfluoreszenz Analysen an *Mef2>>msn-RNAi* exprimierenden Genitalscheiben sowie adulten Testes. Auf Genitalscheiben sind Myoblasten sowie naszierende Myotuben durch mCD8-GFP markiert. Die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt, Phalloidin färbt F-Aktin in der Testismukulatur. Nach muskelspezifischer *msn*-Herunterregulation detektiert der Duf-Antikörper das Protein in FC-artigen Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) 24 h APF (A-A''). Auf auswachsenden Seminal Vesicles 30 h APF ist aktivierte MAPK in außenliegenden Myotuben sichtbar (B-B''). CadN, das in wildtypischen Testes die Membranen der Testismuskeln markiert (C-C''), ist nach *msn*-Herunterregulation nur in vereinzelt Punkten sichtbar (D-D''). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Hierbei ist die Kinase *Msn* essentiell für eine effiziente Migration naszierender Myotuben auf dem Testis in Richtung Spitze sowie für die richtige Organisation der Testes-Myotuben.

#### 4.7 Analysen des FGF Signalweges hinsichtlich einer Relevanz in der Migration von Testes-Myotuben

##### 4.7.1 Der FGF Signalweg ist während der Migration von Testes-Myotuben aktiviert

Um herauszufinden, welcher RTK-Signalweg in naszierenden Myotuben aktiv ist und somit die Migration der Testes-Myotuben steuern könnte, wurde zunächst der FGF Signalweg mithilfe von Immunfluoreszenz Analysen untersucht. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers (Vincent et al., 1998) wurde das intrazelluläre Adapterprotein Stumps in *Mef2>>mCD8-GFP* exprimierenden Genitalscheiben und Testes analysiert. Auf auswachsenden Seminal Vesicles 24 h APF konnte Stumps im Cytoplasma der inneren Myoblastenschicht detektiert werden, den sogenannten FC-artigen Myoblasten (Abb. 25 A-A''). Bei 30 h APF lokalisierte Stumps im Cytoplasma der naszierenden Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles (Abb. 25 B-B'') sowie auf pupalen Testes (Abb. 25 C-C''). Zusätzlich co-lokalisierte Stumps mit der aktivierten MAPK Erk bei 30 h APF in naszierenden Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles (Abb. 25 D-D'') und Testes (Abb. 25 E-E'').



**Abbildung 25: Stumps und aktivierte MAPK Erk co-lokalisieren in naszierenden Testes-Myotuben.** Immunfluoreszenz Analysen an Genitalscheiben und pupalen Testes. Myoblasten sowie naszierende Myotuben sind durch *Mef2>>mCD8-GFP* markiert, die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt. Der Antikörper detektiert Stumps im Cytoplasma von FC-artigen Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles (vs) 24 h APF (A-A“). Bei 30 h APF ist Stumps in naszierenden Myotuben auf Genitalscheiben (B-B“) und pupalen Testes (C-C“) detekrierbar. Stumps und aktivierte MAPK Erk co-lokalisieren in naszierenden Myotuben auf Genitalscheiben (D-D“) sowie pupalen Testes (E-E“) bei 30 h APF. Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Immunfluoreszenz Analysen deuten darauf hin, dass der FGF Signalkweg in naszierenden Myotuben während der Migration bei ca. 30 h APF aktiviert ist.

#### 4.7.2 Die *Heartless*-abhängige FGF Signalkette ist wesentlich für die Migration naszierender Myotuben

Um Hinweise auf den Einfluss des FGF Signalweges während des Migrationsprozesses zu erhalten, wurden funktionelle Analysen mithilfe von RNAi-vermittelter Herunterregulation verschiedener FGF Komponenten durchgeführt. Hierzu wurden die Treiberlinien *Mef2-Gal4* sowie *UAS-Dcr2;;Mef2-Gal4* verwendet. In den resultierenden  $F_1$ -Generationen wurden die männlichen Reproduktionsorgane analysiert, ebenfalls wurde die Fertilität untersucht. Die Ergebnisse der RNAi-Analysen sind in Tabelle 14 und Abbildung A35 aufgeführt. Exemplarisch werden hier die muskelspezifischen Herunterregulationen von *heartless* (*htl*) und *stumps* charakterisiert. Ein Teil der Ergebnisse der restlichen Kreuzungen ist im Anhang abgebildet (Abb. A29-A34).

**Tabelle 14:** Übersicht RNAi-vermittelter Herunterregulationen einiger FGF Komponenten

Kreuzung	Muskulatur und Morphologie adulter Reproduktionsorgane	Fertilität
Mef2>> <i>pyr</i> -RNAi v36523**	Mu – TE: Hubregion frei von Muskeln; VS: Muskeln vernetzt; Rest wt Mo – TE: klein und kurz, stark vergrößerte Spitze; Rest wt	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2;; <i>ths</i> -RNAi v24536**	Mu – wt Mo – wt	97 %
Mef2>>Dcr-2;; <i>ths</i> -RNAi v102441	Mu – wt Mo – wt	78 %
Mef2>>Dcr-2;; <i>btl</i> -RNAi BL35024**	Mu – TE: keine Muskeln in der Hubregion; Rest wt Mo – TE: stark verdickte Testisspitze; Rest wt	21 %
Mef2>> <i>btl</i> -RNAi v6692*	Mu – TE: keine Muskeln; VS, DE: evtl. vereinzelte Muskeln; PG: wenige misorientierte Muskeln; SP: keine Muskeln Mo – TE: klein und rund, keine Verbindung zum Seminal Vesicle; Rest klein und deformiert	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2;; <i>bnl</i> -RNAi BL34572**	Mu – wt Mo – wt	97 %
Mef2>>Dcr-2;; <i>btl</i> -RNAi BL40871	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>>Dcr-2;; <i>btl</i> -RNAi v27106**	Mu – wt Mo – wt	93 %
Mef2>> <i>csw</i> -RNAi v108352**	Mu – TE: Löcher, große Abstände zwischen Muskeln; Rest wt Mo – wt	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2;; <i>csw</i> -RNAi v108352	Mu – TE: z.T. große Löcher zwischen Muskeln; Rest wt Mo – wt	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2;; <i>csw</i> -RNAi BL31760	Mu – wt Mo – wt	100 %
Mef2>> <i>stumps</i> -RNAi v21317*	Mu – variabel, TE: z.T. keine Muskeln, z.T. Hubregion frei von Muskeln; DE, VS, PG: misorientierte, übereinander laufende Muskeln; SP: keine Muskeln erkennbar Mo – variabel, TE: z.T. klein und rund, aber verbunden zum Seminal Vesicle; Rest klein und deformiert	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>>Dcr-2; <i>stumps</i> -RNAi v21317	Mu – variabel, TE: z.T. keine Muskeln, z.T. vereinzelte Muskeln sichtbar; DE, VS, PG: vereinzelte misorientierte Muskeln; SP: keine Muskeln erkennbar Mo – variabel, TE: z.T. klein und rund, aber verbunden zum Seminal Vesicle; Rest klein und deformiert	n.d. <sup>1</sup>

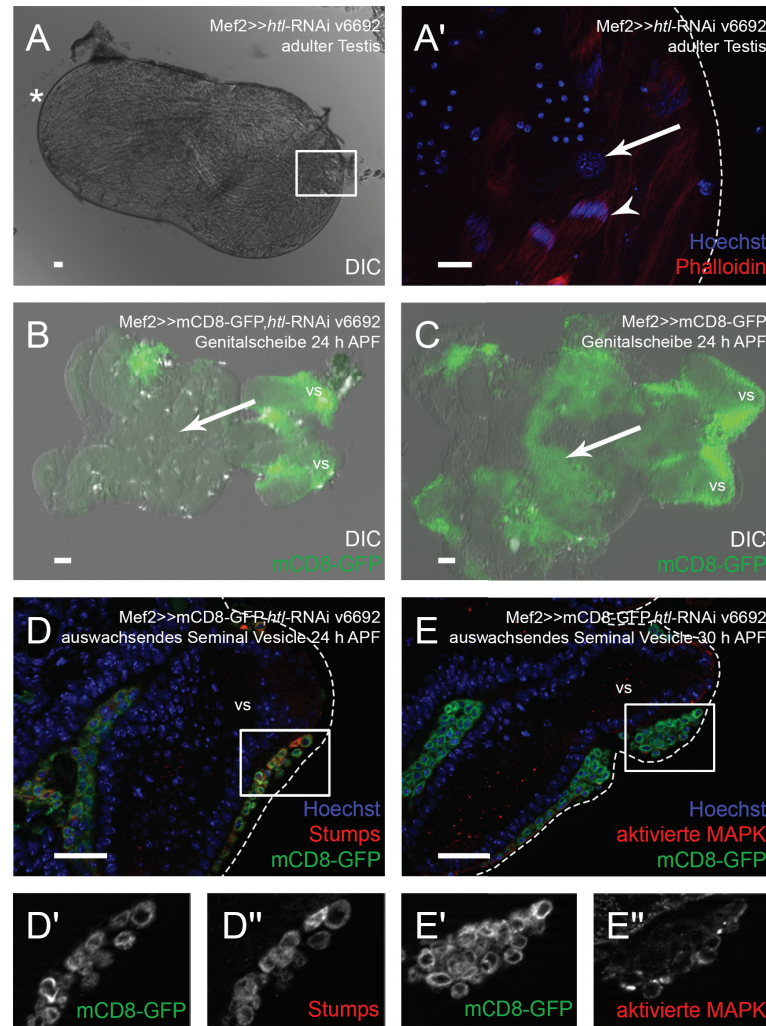
Mef2>> <i>stumps</i> - RNAi v105603	Mu – variabel, TE: z.T. große Bereiche ohne Muskeln, vorhandene Muskeln stark gestört; DE, VS, PG: vereinzelte misorientierte Muskeln; SP: keine Muskeln erkennbar Mo – variabel, TE: z.T. klein und rund, aber verbunden zum Seminal Vesicle; Rest klein und deformiert	n.d. <sup>1</sup>
Mef2>> <i>Dcr-2</i> ; <i>stumps</i> -RNAi v105603	Mu – variabel, TE: z.T. keine Muskeln, z.T. Hub-region frei von Muskeln; DE, VS, PG: vereinzelte misorientierte Muskeln; SP: keine Muskeln erkennbar Mo – variabel, TE: z.T. klein und rund, aber verbunden zum Seminal Vesicle; Rest klein und deformiert	n.d. <sup>1</sup>

Mu = Muskeln; Mo = Morphologie; TE = Testis; VS = Seminal Vesicle; DE = Ductus ejaculatus; PG = Paragonium; SP = Spermiumpumpe; wt = wildtypisch; n.d. = nicht durchgeführt; <sup>1</sup> pharat letal; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang

In *Drosophila* gibt es mit Breathless (Btl) und Htl zwei FGF-Rezeptoren (FGFRs) (Glazer & Shilo, 1991; Shishido et al., 1993), wobei Stumps von beiden FGFRs angesteuert wird. Da eine muskelspezifische Herunterregulation von *btl* nicht zu offensichtlichen Defekten der Testismuskulatur führte (Abb. A33), wurde der zweite Rezeptor, Htl untersucht.

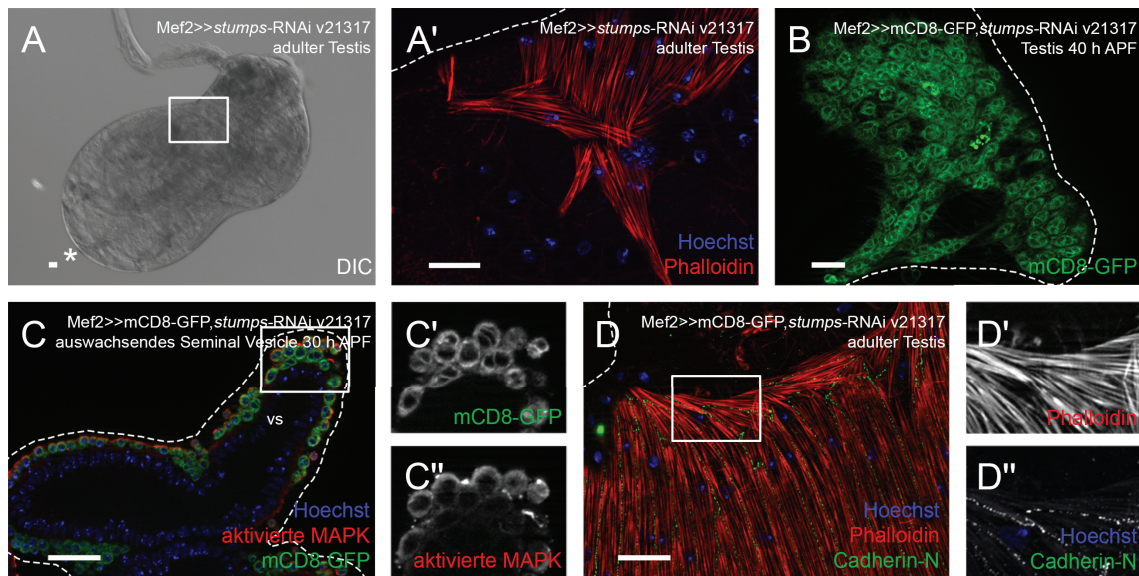
Durch die Myoblasten-spezifische Herunterregulation von *htl* wurden sehr starke Defekte der männlichen Reproduktionsorgane erzeugt. Die resultierenden Fliegen waren pharat lethal, die Testes wiesen nie eine Verbindung zum Seminal Vesicle auf und erinnerten in ihrer rundlichen Form an pupale Testes (Abb. 26 A). Die Testishülle wies keine Muskeln auf, jedoch waren Pigmentzellen sichtbar (Abb. 26 A', Pfeil). Die Spermatogenese schien jedoch normal abzulaufen in diesen Testes, da Spermienbündel kurz vor bzw. während der Individualisierung beobachtet werden konnten (Abb. 26 A', Pfeilkopf). Die anderen Reproduktionsorgane wiesen ebenfalls keine bzw. nur vereinzelte Muskeln auf (Tab. 14). Diese Phänotypen können darauf zurückzuführen sein, dass *htl*-herunterregulierte Genitalscheiben bei 24 h APF viel weniger Myoblasten aufwiesen als wildtypische Genitalscheiben (Abb. 26 B-C, Pfeile). Auf auswachsenden Seminal Vesicles 24 h sowie 30 h APF waren ebenfalls weniger Myoblasten bzw. Myotuben vorhanden als in Wildtypen (Abb. 26 D, E, im Vergleich zu Abb. 25 A, D). Die vorhandenen Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles 24 h APF exprimierten jedoch Stumps (Abb. 26 D-D'), naszierende Myotuben bei 30 h APF wiesen außerdem aktivierte MAPK auf (Abb. 26 E-E').





**Abbildung 26: Muskelspezifische Herunterregulation von *heartless* stört die Entwicklung der Testismuskeln.** Immunfluoreszenz Analysen an *Mef2>>htl-RNAi* exprimierenden Genitalscheiben sowie adulten Testes. Auf Genitalscheiben sind Myoblasten sowie naszierende Myotuben durch mCD8-GFP markiert. Die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt, Phalloidin färbt F-Aktin in der Testismuskulatur. Nach muskelspezifischer *htl*-Herunterregulation sind adulte Testes weder mit dem Seminal Vesicle verbunden noch elongiert (A). Die Testishülle beinhaltet keine Muskeln, jedoch Pigmentzellen (Pfeil). Individualisierende Spermienbündel sind im Testis sichtbar (Pfeilkopf) (A'). Die Menge an Myoblasten ist im posterioren Bereich der Genitalscheibe (Pfeile) stark reduziert (B) im Vergleich zum Wildtyp (C). Die Herunterregulation von *htl* ändert die Expression von Stumps in Myoblasten bei 24 h APF jedoch nicht (D-D''). Naszierende Myotuben bei 30 h APF weisen außerdem aktivierte MAPK auf (E-E''). Das Sternchen markiert die Hubregion, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Die muskelspezifische *stumps*-Herunterregulation resultierte hauptsächlich in adulten Testes, die eine Verbindung zum Seminal Vesicle aufwiesen, jedoch nicht elongiert waren (Abb. 27 A). Die Muskeln waren nur am basalen Ende des Testis lokalisiert und wiesen Probleme in der Orientierung auf (Abb. 27 A'). Pupale Testes 40 h APF wiesen trotz herunterreguliertem *stumps* naszierende Myotuben auf (Abb. 27 B). Auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 30 h APF war aktivierte MAPK in naszierenden Myotuben detektierbar (Abb. 27 C-C''). In adulten *stumps*-herunterregulierten Testismuskeln war CadN zwischen benachbarten Myotuben normal exprimiert (Abb. 27 D-D''), jedoch nicht an Stellen ohne Adhäsion zwischen Myotuben, wo Löcher in der Testismuskulatur entstanden (Abb. 27 D-D'').



**Abbildung 27: RNAi-vermittelter *stumps*-knock-down behindert die Migration der Testes-Myotuben.** Immunfluoreszenz Analysen an *Mef2>>stumps-RNAi* exprimierenden Genitalscheiben und Testes. Auf Genitalscheiben und pupalen Teses sind Myoblasten sowie naszierende Myotuben durch mCD8-GFP markiert. Die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt, Phalloidin färbt F-Aktin in der adulten Testismuskulatur. Nach muskelspezifischer *stumps*-Herunterregulation sind adulte Testes zwar mit dem Seminal Vesicle verbunden, jedoch nicht elongiert (A). Einige Muskeln sind am basalen Ende des Testis zu finden und sind teilweise misorientiert (A'). Auf pupalen Testes 40 h APF sind trotz der Herunterregulation von *stumps* einige naszierende Myotuben zu finden. Naszierende Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 30 h APF weisen aktivierte MAPK auf (C-C'). CadN ist zwischen benachbarten Myotuben detektierbar, jedoch nicht bei Löchern (D-D'). Das Sternchen markiert die Hubregion, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

Vergleichbar zur *htl*-Herunterregulation war auf einigen Genitalscheiben 24 h APF im hinteren Bereich die Menge an Myoblasten teilweise reduziert, wobei Duf bei 24 h APF normal exprimiert war (Abb. A36). Die Herunterregulation von *stumps* konnte mithilfe des Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. A36).

Die Ergebnisse der RNAi-Analysen indizieren, dass ein *Htl*-abhängiger FGF Signalweg die Migration der naszierenden Testes-Myotuben von der Genitalscheibe auf den Testis steuert. *Htl* scheint essentiell zu sein, um den Testis mit Myotuben zu besiedeln. Auf welcher Ebene der Defekt einsetzt, oder ob FGF Signalketten eine multiple Rolle bei der Entwicklung der Testismuskulatur spielen, bleibt zu klären.

#### 4.7.3 Ein *Breathless*-abhängiger FGF Signalweg beeinflusst die Fusion Testes-relevanter Myoblasten

Da die Testismuskeln nach der Herunterregulation verschiedener FGF Komponenten teilweise nicht mehrkernig erschienen (Abb. A34), wurde die Anzahl der Zellkerne bestimmt, um Hinweise auf Fusionsstörungen zu erhalten. Hierzu wurden pupale Testes bei 42 h APF wie zuvor beschrieben (siehe 4.3.5) analysiert. Anhand der durchschnittlichen Kernzahlen der  $F_1$ -Generation sowie der ungetriebenen RNAi wurde der Fusionsindex bestimmt.

Die Ergebnisse der Kernzählungen für die Komponenten Thisbe (Ths), Branchless (Bnl), Btl sowie Corkscrew (Csw) sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Schwache Fusionsdefekte traten bei der Herunterregulation von dem FGFR Btl, dessen Liganden Bnl sowie dem intrazellulären Protein Csw auf, nicht aber bei Ths, dem Liganden von Htl. Diese Ergebnisse implizieren, dass ein Btl-abhängiger FGF Signalweg die Fusion Testes-relevanter Myoblasten auf der Genitalscheibe beeinflusst, evtl. durch eine Induktion der Fusion. Hierbei war auffällig, dass in keinem Fall ein Fusionsdefekt mit verminderter Fertilität einherging (Abb. A35).

**Tabelle 15:** Ergebnisse der Kernzahlbestimmungen verschiedener FGF Komponenten

Kreuzung	Kernzahl F <sub>1</sub> - Generation	Kernzahl Effektorlinie	Fusionsindex F <sub>1</sub>	Fusionsdefekt
Mef2>>Dcr-2; <i>ths</i> - RNAi v24536	2,6	2,9	0,9	kein
Mef2>>Dcr-2; <i>bnl</i> - RNAi BL34572	2,1	2,9	0,72	schwach
Mef2>>Dcr-2; <i>btl</i> - RNAi BL40871	2,3	3,3	0,7	schwach
Mef2>>Dcr-2; <i>btl</i> - RNAi v27106	2,4	3,2	0,75	schwach
Mef2>>Dcr-2; <i>csw</i> - RNAi v108352	2,3	3	0,77	schwach

Die beiden FGFRs in *Drosophila* tragen somit essentiell zur Bildung einer funktionellen mehrkernigen Testismuskulatur bei, Btl möglicherweise durch eine Induktion oder Begünstigung der Fusion oder durch Entstehung einer ausreichenden Zahl an Testes-relevanten Myoblasten, Htl durch die Regulation der Migration naszierender Myotuben auf die Testes.

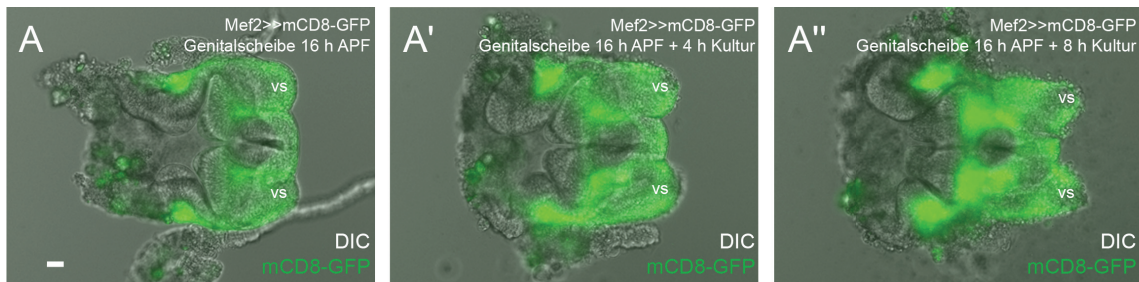
#### 4.8 In *ex vivo* Co-Kulturen aus Genitalscheiben und Testes kann die Migration naszierender Testes-Myotuben verfolgt werden

Da die Migration der naszierenden Testes-Myotuben weder von der Genitalscheibe auf den Testis noch auf dem Testis Richtung Testisspitze *in vivo* verfolgt werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für *ex vivo* Co-Kulturen etabliert. Diese *ex vivo* Co-Kulturen aus Genitalscheiben und pupalen Testes wurden in „live imaging“ Experimenten verwendet, um die Migrationsprozesse zu verfolgen. Die Co-Kulturen konnten für Genitalscheiben sowie pupale Testes verschiedener Entwicklungsstufen eingesetzt werden. Hierbei wurden immer Mef2>>mCD8-GFP exprimierende Gewebe eingesetzt, um die Myoblasten und naszierenden Myotuben zu visualisieren.

In Kultur genommene Genitalscheiben 16 h APF wiesen auf den auswachsenden



Seminal Vesicles bereits Testes-relevante Myoblasten auf (Abb. 28 A). Nach vier Stunden in Kultur waren die Seminal Vesicles ein Stück gewachsen und das Signal der mCD8-GFP-positiven Myoblasten war deutlich verstärkt (Abb. 28 A'). Acht Stunden nach dem Beginn der Co-Kultur waren die sich entwickelnden Seminal Vesicles noch weiter gewachsen und das GFP-Signal deutlich erhöht (Abb. 28 A''), was auf eine Proliferation der Myoblasten *ex vivo* hinweist.



**Abbildung 28: Genitalscheiben entwickeln sich *ex vivo* weiter.** Aufnahmen aus „live imaging“ Experimenten einer *ex vivo* Co-Kultur aus Genitalscheiben und Testes. Die Myoblasten sind durch mCD8-GFP markiert. Die Genitalscheibe weist 16 h APF Testes-relevante Myoblasten auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles (vs) auf (A). Während der achtstündigen Aufnahmen wachsen die Seminal Vesicles aus, die Myoblastenmenge auf der Genitalscheibe erhöht sich (A'-A''). Maßstabsbalken: 20 µm.

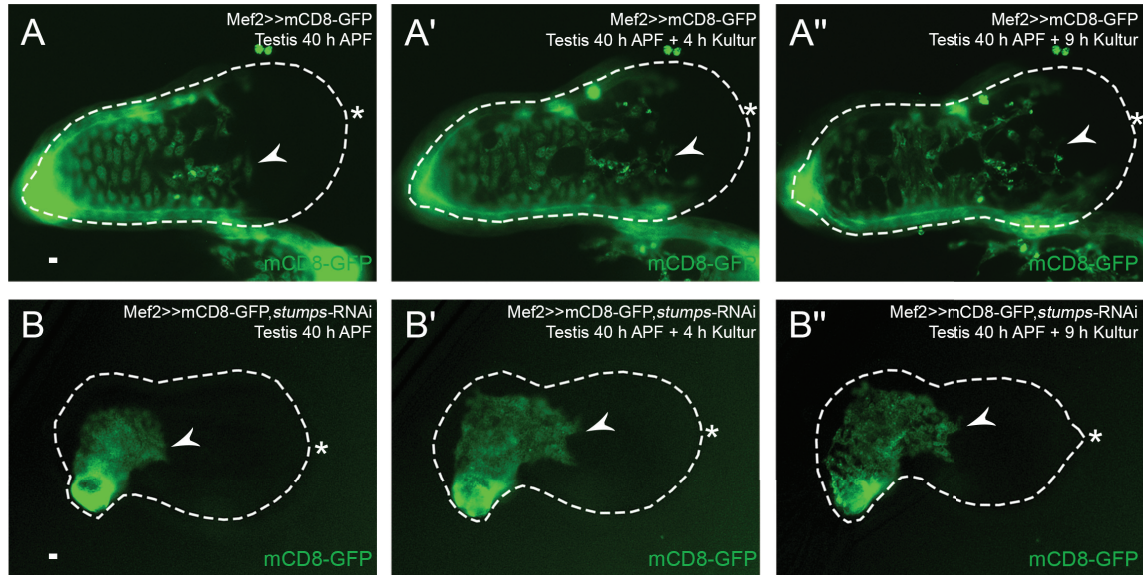
Auch bei Genitalscheiben 8 h APF konnte ein Auswachsen der Seminal Vesicles sowie eine starke Proliferation der Testes-relevanten Myoblasten beobachtet werden (Abb. A37).

#### 4.8.1 Stumps wird für die Migration naszierender Myotuben auf dem Testis benötigt

Die Migration der naszierenden Myotuben von der Genitalscheibe auf die Testes konnte zwar in Kultur bisher nicht beobachtet werden, doch der Prozess der Migration auf den Testes war *ex vivo* zu verfolgen. Hierzu wurden Testes 40 h APF in Kultur genommen, die immer noch mit einem Teil der auswachsenden Seminal Vesicles verbunden waren, jedoch nicht mit der Genitalscheibe. Zu Beginn der Aufnahmen waren ca. 60% des Testis mit multinukleären naszierenden Myotuben bedeckt (Abb. 29 A, Pfeilkopf). Vier Stunden später hatten sich die Myotuben auf dem Testis verteilt und waren ein Stück Richtung Testisspitze gewandert (Abb. 29 A', Pfeilkopf). Weitere fünf Stunden später bedeckten die Myotuben bereits ca. 80% der sichtbaren Testisoberfläche (Abb. 29 A'', Pfeilkopf). Während der neun Stunden war der Testis in der Länge gewachsen und hatte die Form etwas verändert.

Um herauszufinden, wie dieser Migrationprozess auf pupalen Testes ablaufen würde, wenn *stumps* herunterreguliert ist, wurden Testes 40 h APF mit Myoblasten-spezifischer Expression von mCD8-GFP sowie *stumps*-RNAi in Co-Kultur genommen. Diese Testes waren ebenfalls noch mit einem Teil des sich entwickelnden Seminal Vesicles verbunden. Naszierende Myotuben bedeckten zu Beginn der Aufnahmen ca. 30% der sichtbaren Oberfläche

(Abb. 29 B, Pfeilkopf). Vier Stunden später waren ca. 40% der Testisoberfläche mit Myotuben bedeckt (Abb. 29 B', Pfeilkopf). Nach weiteren fünf Stunden war keine Migration der Myotuben sichtbar, weiterhin waren nicht mehr als ca. 40% des Testis mit naszierenden Myotuben bedeckt (Abb. 29 B'', Pfeilkopf). Während der neunstündigen „live imaging“ Experimente wuchs der Testis kaum in der Länge.



**Abbildung 29: Stumps beeinflusst die Migration der Testes-Myotuben.** Aufnahmen aus „live imaging“ Experimenten einer *ex vivo* Co-Kultur aus Genitalscheiben und Testes 40 h APF. Naszierende Myotuben sind durch mCD8-GFP markiert. In der wildtypischen Situation elongiert der Testis und naszierende Myotuben migrieren während der neunstündigen Aufnahmen in Richtung der Testisspitze (A-A''). Bei einer muskelspezifischen Herunterregulation von *stumps* ist die Geschwindigkeit sowie zurückgelegte Distanz der migrierenden naszierenden Myotuben sichtbar reduziert (B-B''). Pfeilköpfe kennzeichnen die Front der migrierenden Myotuben, Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

Die Analyse der muskelspezifischen Herunterregulation von *stumps* mithilfe der „live imaging“ Experimente zeigt deutlich, dass Stumps in naszierenden Testes-Myotuben zwar nicht benötigt wird, um auf den Testis zu gelangen, jedoch essentiell für deren Migration in Richtung Testisspitze ist.



## 5. Diskussion

### 5.1 GFP-Enhancertraps sind nur bedingt einsetzbar, um die Migration naszierender Myotuben zu untersuchen

Mithilfe von GFP-Traps wurde der *fz2* Enhancertrap als vielversprechend identifiziert. Das Expressionsmuster ist jedoch breiter als die endogene Expression. Dies könnte durch eine zweite Enhancertrap Insertion auf dem Chromosom zustande kommen. Außerdem war GFP ausschließlich in Zellkernen zu detektieren (Abb. 9), was ein Artefakt sein könnte. Wie bereits in früheren Studien gezeigt, kann GFP im Zellkern mislokalisieren (Seibel et al., 2007). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass einige der hier untersuchten GFP-Traps oder Enhancertraps geeignet waren, um Gene sowie Signalwege zu identifizieren, die an der Migration der Testes-Myotuben beteiligt sein könnten.

### 5.2 Es muss weiter nach geeigneten Treiberlinien für die Migration naszierender Testes-Myotuben gesucht werden

Da Mef2-Gal4 den Nachteil hat, die Expression in allen Myoblasten auf der Genitalscheibe zu treiben (Kuckwa et al., 2016), wurde nach einer spezifisch in Testes-relevanten Myoblasten treibenden Gal4-Treiberlinie gesucht. Weiterhin wären Treiberlinien wünschenswert, mit deren Hilfe die Quelle der Liganden indentifiziert werden kann. Da unter den zwölf getesteten Gal4-Treiberlinien keine war, die eine spezifische Expression in Testes-relevanten Myoblasten aufwies (Tab. A2), wurden für die funktionellen Analysen mittels RNAi-vermitteltem knock-down die Treiberlinien Mef2-Gal4 bzw. UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4 verwendet.

In Zukunft könnte sich das Gen *Sox100B* als geeigneter Kandidat für die Expression in Pigmentzellen anbieten. Sox100B ist bereits in Embryonen in Pigmentzell-Vorläufern exprimiert, die Expression bleibt in den folgenden Entwicklungsstadien durchgehend in Pigmentzellen erhalten (Nunda et al., 2009). Mithilfe von Sox100B-Gal4 könnte man möglicherweise Liganden herunterregulieren, die in die Migration von Testes-Myotuben involvierte Signalwege aktivieren. Wenn beispielsweise die Herunterregulation von *DWnt2* mithilfe von Sox100B-Gal4 einen vergleichbaren Phänotyp produzieren sollte wie muskelspezifisch herunterreguliertes *fz2*, ann man daraus ableiten, dass die Pigmentzellen *DWnt2* sekretieren und damit die Migration der Testes-Myotuben regulieren.

Andere praktische Treiberlinien wären solche, die im Epithel der sich entwickelnden Seminal Vesicles oder im terminalen Epithel pupaler Testes die Expression treiben, da auch diese Zellen relevante Liganden exprimieren könnten. Fasciclin 3 (Fas3) ist bisher das einzig bekannte Protein, das spezifisch im Epithel der auswachsenden Seminal Vesicles exprimiert

wird (Daten nicht gezeigt). Da der Bedarf an neuen, spezifischen Treiberlinien groß ist, sollte in zukünftigen Arbeiten weiter nach passenden Proteinen gesucht werden.

### 5.3 Der kanonische Wnt Signalweg ist an Zellmigrationsprozessen beteiligt

Vorherige Studien zeigten, dass DWnt2 die Determination von Pigmentzellen auf pupalen Testes beeinflusst und ein Verlust von DWnt2 die Besiedlung der Testes mit Muskeln stört (Kozopas et al., 1998). Diese geringe Anzahl an Testismuskeln könnte allerdings auch aus einer fehlerhaften Migration der Pigmentzellen hervorgehen. Da die Publikation viele Fragen bezüglich einer Funktion von DWnt2 bzw. dem kanonischen Wnt Signalweg offenließ und der kanonische Wnt Signalweg unter anderem auch in der Zellmigration der Seitenlinienanlage im Zebrafisch eine wichtige Rolle spielt (Aman und Piotrowski, 2008), wurde der Signalweg im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Beteiligung an der Migration naszierender Testes-Myotuben untersucht.

#### 5.3.1 Die Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges werden vermutlich in Testes-relevanten Myoblasten transkribiert

Transkripte der Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges konnten in Myoblasten der Genitalscheibe nachgewiesen werden (Tab. 1). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die verwendete RNA aus allen Myoblasten der Genitalscheibe stammt, und nicht spezifisch aus Testes-relevanten Myoblasten. Die untersuchten Komponenten müssen demnach nicht oder nicht nur in Testes-relevanten Myoblasten transkribiert werden. Die Transkription in Myoblasten über einen Zeitraum von 22 Stunden deutet darauf hin, dass die entsprechenden Proteine in den Myoblasten exprimiert werden. Eine Aussage zur zeitlichen und räumlichen Expression kann mithilfe spezifischer Antikörper oder *in situ* Hybridisierungen gewonnen werden. Daher wurde die Transkription der Rezeptoren Fz2 und Fz3, des Co-Rezeptors Arr, sowie der Komponenten Arm und Pan zusätzlich mithilfe von *in situ* Hybridisierungen untersucht. Mithilfe der *in situ* Hybridisierungen konnten *fz2* Transkripte in Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles 30 h APF detektiert werden, allerdings auch in Epithelien der Genitalscheibe sowie im terminalen Epithel der pupalen Testes (Abb. 10). Die Detektion der Transkripte im terminalen Epithel könnte darauf hindeuten, dass die Expression des *fz2* Enhancertraps im terminalen Epithel (Abb. 9) nicht artifiziell war, der Fz2 Antikörper detektierte hier zwar kein Protein, das könnte allerdings auch daran liegen, dass der Antikörper nicht tief genug in den Testis eindringen konnte (Abb. 12). Jedoch würde eine Expression des Fz2 Rezeptors im terminalen Epithel im Testis auf eine andere Funktion als die Migration der Testes-Myotuben hindeuten.

Da die *in situ* Hybridisierung von *arr* mit beiden Sonden Signale im Cytoplasma der männlichen Keimzellen erbrachte und für *pan* und *fz3* keine bzw. widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden, sollten die Ergebnisse von *in situ* Hybridisierungen auf Genitalscheiben und pupalen Testes mithilfe anderer Methoden verifiziert werden.

Die Transkriptionsanalysen könnten dennoch darauf hindeuten, dass die Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges in naszierenden Testes-Myotuben während der Migration von der Genitalscheibe auf die Testes transkribiert werden.

### **5.3.2 Der kanonische Wnt Signalweg wird in Testes-relevanten Myoblasten oder Testes-Myotuben aktiviert**

Transkripte der Gene *nemo*, *naked cuticle* und *engrailed* waren in Myoblasten detektierbar, während *Notum* keine Transkription aufwies (Tab. 2). Diese vier Gene sind bekannte Zielgene des kanonischen Wnt Signalweges, sie werden durch eine Aktivierung des Wnt Signalweges transkriptionell hochreguliert (Giráldez et al., 2002; Hooper, 1994; Zeng et al., 2000; Zeng & Verheyen, 2004). Transkripte von *nemo* und *naked cuticle* konnten außerdem in naszierenden Myotuben auf pupalen Testes bei 30 h APF nachgewiesen werden (Abb. 11).

Die Transkripte von *nemo*, *naked cuticle* und *engrailed* deuten darauf hin, dass in Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe der kanonische Wnt Signalweg aktiviert und somit die Transkription dieser Gene induziert wurde. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl Nemo als auch Naked cuticle wiederum als Antagonisten des Wnt Signalweges agieren (Rousset et al., 2001; Zeng & Verheyen, 2004). Die Kinase Nemo phosphoryliert vermutlich Arm oder Pan und inhibiert damit den Wnt Signalweg, wird selbst aber nur durch ein sehr starkes Wnt Signal aktiviert (Mirkovic et al., 2011; Zeng & Verheyen, 2004). Naked cuticle inhibiert den Wnt Signalweg durch eine Interaktion mit Dishevelled (Rousset et al., 2001).

Die Transkription von drei von vier Wnt-Zielgenen impliziert, dass der kanonische Wnt Signalweg zu einem oder mehreren Zeitpunkten der Metamorphose in Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe aktiviert wird.

### **5.3.3 Über Frizzled2 könnte der kanonische Wnt Signalweg in Testes-relevanten Myoblasten aktiviert werden**

Immunfluoreszenz Analysen zeigten Fz2 in FC- sowie FCM-artigen Zellen auf Genitalscheiben und Testes (Abb. 12). Die Anwesenheit von Fz2 in naszierenden Myotuben auf dem Testis spricht dafür, dass der Wnt Signalweg auch während der Migration der Testes-Myotuben aktiviert ist. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Anwesenheit des Rezeptors zwar die Möglichkeit der Aktivierung anzeigt, jedoch nicht die Aktivierung selbst.

Bezüglich einer möglichen Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges wurden Arm und Gro analysiert. Es konnte zwar keine Akkumulation von Arm nachgewiesen werden, jedoch war der transkriptionelle Co-Repressor Gro nicht im Zellkern naszierender Myotuben aufzufinden (Abb. 12). Die Lokalisation von Gro im Cytoplasma könnte auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges hindeuten. Bei Immunfluoreszenz Analysen ist jedoch zu beachten, dass Antikörper nur begrenzt in Gewebe eindringen können bzw. die Eindringtiefe je nach Antikörper und Experiment variieren kann. Außerdem ist die Stärke der Signale mitunter von dem verwendeten Mikroskop abhängig. Immunfluoreszenz Analysen sollten demnach nicht als einziger Nachweis genutzt werden, sondern durch andere Experimente überprüft werden.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz Analysen schließen dennoch eine mögliche Beteiligung des kanonischen Wnt Signalweges an der Migration der Testes-Myotuben nicht aus, wobei Fz2 der Rezeptor sein könnte.

#### **5.3.4 Frizzled2, Armadillo sowie Shaggy tragen zur Entwicklung der Testismuskulatur bei**

Die Untersuchungen zu möglichen Funktionen verschiedener Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges mittels RNAi-induziertem knock-down resultierten in recht unterschiedlichen Phänotypen (Tab. 3).

Die muskelspezifische Herunterregulation von *fz2* brachte keine Defekte hervor, die man bei einer Beteiligung von Fz2 an der Migration der Testes-Myotuben erwarten würde. Da es aber vier Frizzled-Rezeptoren in *Drosophila* gibt und zumindest Frizzled3 und Frizzled4 in Myoblasten auf der Genitalscheibe transkribiert werden (Tab. 1), könnte bei der Herunterregulation von Frizzled2 ein anderer hochreguliert werden. Die Muskeln wirkten so gestört, dass der Gedanke an einen Zellpolaritäts-Defekt naheliegend war. Frühere Studien zeigten, dass *Drosophila* Fz2 mit Off-track (Otk) und Otk2 Komplexe bilden kann (Linnemannstöns et al., 2014). Eine analoge Interaktion konnte auch bei Vertebraten gezeigt werden (Peradziryi et al., 2011; Peradziryi et al., 2012). Obwohl Otk und Otk2 nicht wie das Vertebraten-Homolog PTK7 essentiell für die Kontrolle der planaren Zellpolarität sind (Linnemannstöns et al., 2014), könnte die Herunterregulation von *fz2* über Otk und/oder Otk2 den nichtkanonischen PCP Signalweg anstelle des kanonischen Wnt Signalweges beeinflussen. Die Überschneidungen der kanonischen und nicht-kanonischen Komponenten erschwert die Untersuchung eines spezifischen Wnt Signalweges. Da zwei der vier untersuchten Linien keine Defekte in den Muskelschichten der Reproduktionsorgane hervorrie-

fen, ist davon auszugehen, dass diese beiden RNAi-Linien nicht funktionieren. Tatsächlich zeigte die Überprüfung einer der beiden Linien eine weitgehend normale Fz2 Expression in Testes-relevanten Myoblasten (Abb. A18). Überraschenderweise war diese RNAi-Linie bereits veröffentlicht worden, zwar mit einem schwachen Defekt, jedoch als funktionell beschrieben (Lüchtenborg et al., 2014). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass RNAi-Linien nach Möglichkeit mithilfe von Antikörpern überprüft werden sollten.

Die Herunterregulation von *Apc* sollte ebenso wie die von *sgg* eine Überaktivierung des kanonischen Wnt Signalweges hervorrufen, da Arm nicht mehr degradiert werden kann. Die hier verwendeten *Apc*- und *sgg*-RNAi-Linien waren bereits als funktionell veröffentlicht (*Apc*: De Graeve et al., 2012; *Sgg*: Reim et al., 2014). Der knock-down von *Apc* in Myoblasten rief jedoch keine Defekte in der Testismuskulatur hervor (Abb. A13). Neben dem untersuchten Protein APC-like gibt es noch *Apc2* in *Drosophila* (Akong et al., 2002), daher kann das Ausbleiben eines Defektes auf eine Redundanz zurückzuführen sein. Bei herunterreguliertem *sgg* zeigten teils große Löcher in der Hubregion der Testismuskulatur Migrationsdefekte an (Abb. A14). Die RNAi-Linie könnte für weitere Arbeiten mit dem Arm Antikörper auf Akkumulationen von Arm hin untersucht werden. Bei einer tatsächlich vorliegenden Überaktivierung kann man evtl. eine Akkumulation erkennen.

Die muskelspezifische Herunterregulation von *arm* mithilfe einer veröffentlichten RNAi-Linie (König und Shcherbata, 2015) resultierte in überwiegender embryonaler Letalität (Tab. 3). Eine unveröffentlichte *arm*-RNAi-Linie hingegen bewirkte beim muskelspezifischen knock-down viele Verdickungen im Testisschlauch sowie eine sehr fragmentarische Testismuskulatur (Abb. 14). Dieser Phänotyp ähnelt einem durch muskelspezifische Herunterregulation von *CadN* hervorgerufenen Defekt der adulten Testismuskulatur (K. Fritzen, persönliche Kommunikation). Da Arm nicht nur eine Funktion im kanonischen Wnt Signalweg innehat, sondern auch intrazellulär an CadN bindet, und in Verbindung mit CadN die Adhäsion zwischen benachbarten Zellen vermittelt (Bulgakova et al., 2012), ist die Ähnlichkeit der Phänotypen nicht überraschend. Die Löcher in der Testismuskulatur könnten zwei Gründe haben. Einerseits könnte die Migration der naszierenden Testes-Myotuben nicht gestört sein, sondern nur die Adhäsion zwischen benachbarten Muskeln. In diesem Falle würden ausreichend naszierende Myotuben auf die pupalen Testes wandern und diese bedecken, jedoch könnte aufgrund der Störung der Cadherin-vermittelten Adhäsion zwischen einzelnen Myotuben keine geschlossene Muskelschicht entstehen. Da die Muskeln in der RNAi-Situation kürzer erschienen, ist dies eine mögliche Erklärung. Die andere Möglichkeit, wie es zu diesem



Phänotyp kommen kann, beruht auf der Expression von CadN auf pupalen Testes. Bei 44 h APF weisen naszierende Myotuben im basalen Bereich des Testis CadN in der Membran auf. Hier sind Kontakte zwischen den einzelnen Myotuben erkennbar, während Myotuben, die eher in Richtung apikaler Testisspitze lokalisieren, einzeln liegen und keine CadN Expression aufweisen (K. Fritzen, persönliche Kommunikation). Diese verschiedenen Formen der Expression in Abhängigkeit vom Migrationsfortschritt implizieren, dass bei gestörter Zelladhäsion aufgrund von herunterreguliertem *arm* die Zellverbünde der naszierenden Myotuben gestört wären und weniger Myotuben auf die Testes migrierten. Die wenigen Myotuben, die die Testes erreichten, versuchten diese zu bedecken und es entstünde eine Testismuskulatur mit vielen Löchern. Dass die adulten Testes mit muskelspezifischem *arm*-knock-down kleiner erschienen und zu wenige Windungen aufwiesen, spricht für die zweite Erklärung.

### 5.3.5 Ein Frizzled2-abhängiger kanonischer Wnt Signalweg könnte die Fusion Testes-relevanter Myoblasten induzieren

Die muskelspezifischen Herunterregulationen in Kombination mit Dicer-2 von *pan* und *fz2* führten zu schwachen Fusionsdefekten der Testes-relevanten Myoblasten (Tab. 4). Dcr-2 verstärkt den Effekt der RNAi (Pham et al., 2004). Interessanterweise wiesen Myotuben mit herunterreguliertem *sgg* (GSK3 kodierend) mehr Zellkerne auf als die Kontrolltestes der Effektorlinie (Tab. 4). Die Überaktivierung des kanonischen Wnt Signalweges durch reduziertes *Sgg* könnte dementsprechend möglicherweise zu mehr Fusionen führen. Bei herunterreguliertem *pan*, also einer Inaktivierung der Transkription von Wnt-Zielgenen, war das IgSF-Molekül Duf wie im Wildtyp in FC-artigen Myoblasten auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles exprimiert (Abb. 15). Die unveränderte Duf Expression impliziert, dass der Fusionsdefekt nicht durch Defekte in der Differenzierung in FC-artige und FCM-artige Myoblasten hervorgerufen wird. Möglicherweise fungiert der kanonische Wnt Signalweg hingegen als Aktivator der Fusion Testes-relevanter Myoblasten.

### 5.3.6 DWnt2 reguliert vermutlich die Determination der Testes-relevanten Myoblasten

Transkripte verschiedener Wnt Liganden konnten in pupalen Testes detektiert werden (Tab. 5). Bei der RNA aus pupalen Testes ist jedoch zu beachten, dass bis 30 h APF keine naszierenden Myotuben auf Testes vorhanden sind. Pupale Testes bestehen hauptsächlich aus Keimzellen, außerdem sind Cystzellen vorhanden sowie Zellen des terminalen Epithels und Pigmentzellen (Fuller, 1993; Stern, 1941). Die Transkripte könnten demnach aus der großen Menge Keimzellen stammen und relevant für die Spermatogenese sein, ohne einen Einfluss auf die Migration der Testes-Myotuben zu haben.

Die RNAi Analysen mithilfe des Mef2-Gal4 Treibers brachten Muskeldefekte hervor (Tab. 6), die möglicherweise auf ein autokrines Wnt Signal hindeuten. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen nötig. Die ektopische Expression von DWnt2 mithilfe von C855a-Gal4 sowie die Allele *DWnt2<sup>L</sup>* und *DWnt2<sup>O</sup> in trans* störten die Testismuskulatur (Tab. 7). Die misorientierten Muskeln und großen Löcher in der Hubregion aufgrund der ektopischen DWnt2-Expression könnten sowohl auf eine Störung der Zellpolarität wie auch einen Migrationsdefekt hindeuten. Da die ektopische Expression jedoch stark artifiziell ist, wurde dieser Phänotyp nicht weiter charakterisiert. Die amorphen Allele *DWnt2<sup>L</sup>* und *DWnt2<sup>O</sup> in trans* resultierten in Testes mit reduzierter Größe, wie bereits vorherige Studien belegten (Linnemannstöns et al., 2014). Diese Testes wiesen keine glatten, sondern einige gestreifte Muskeln auf (Abb. 17). Diese Daten ähneln den Daten von Kozopas et al. (1998), da diese Publikation eine kleine Menge von Myosin-exprimierendem Gewebe auf adulten Testes mit mangelndem DWnt2 zeigte.

Die Ergebnisse der amorphen *DWnt2* Allele *in trans* suggerieren, dass der Wnt Signalweg primär die Determination der Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe steuert. Diese schließt eine spätere Funktion bei der Migration nicht aus, diese ist jedoch nicht detektierbar, wenn schon die Determination fehl schlägt. Tatsächlich ist beschrieben, dass Wingless in der Embryogenese von *Drosophila* einen Teil der somatischen Muskel Founder Zellen spezifiziert (Baylies et al., 1995).

### 5.3.7 Einordnung der Ergebnisse zum kanonischen Wnt Signalweg

Die Ergebnisse der Analysen des kanonischen Wnt Signalweges deuten darauf hin, dass der Signalweg zu einem oder mehreren Zeitpunkten der Metamorphose in Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe aktiviert wird, der entsprechende Rezeptor könnte Fz2 sein. Da die transkribierten Wnt-Zielgene als Antagonisten des kanonischen Wnt Signalweges fungieren, ist es denkbar, dass zu Beginn der Metamorphose der Signalweg aktiviert wird, dadurch die Zielgene *nemo* und *naked cuticle* transkribiert werden und die resultierenden Proteine wiederum dafür sorgen, dass der Signalweg danach reprimiert wird.

Eine initiale starke Aktivierung und nachfolgende Repression des Signalweges würde zu den Migrationsdefekten passen, die bei Herunterregulation von *sgg*, also einer Überaktivierung des Signalweges entstehen. Die funktionellen Analysen mithilfe von RNAi-Experimenten deuten jedoch auch teilweise auf eine Beteiligung an der korrekten Ausrichtung der Muskeln des Reproduktionstraktes hin, möglicherweise über einen Fz2-vermittelten nicht-kanonischen Wnt Signalweg. Die Ergebnisse des *arm*-knock-downs implizieren, dass Arm

eine duale Funktion in Testes-Myotuben haben könnte. Einerseits vermittelt es über CadN die Adhäsion zwischen Testismuskeln. Andererseits könnten die durch den *arm*-knock-down hervorgerufenen Defekte in der Testismuskulatur in Kombination mit der Transkription der Wnt-Zielgene in naszierenden Myotuben auf den Testes auf eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges während der Migration hindeuten. Die postulierte Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges in migrierenden naszierenden Myotuben auf dem Testis könnte statt der Migration auch Reifungsprozesse der Myotuben regulieren.

Die Untersuchung der *DWnt2* Allele hingegen deutet darauf hin, dass der kanonische Wnt Signalweg essentiell für die korrekte Determination der Testes-relevanten Myoblasten ist. Die gestörte Migration der Testes-Myotuben auf *DWnt2<sup>L</sup>/DWnt2<sup>O</sup>* exprimierenden Testes wäre dabei nur ein sekundärer Effekt.

#### **5.4 Nicht-kanonische Wnt Signalwege können die Migration von Zellen beeinflussen**

Zusätzlich zum oder statt des kanonischen könnte auch ein nicht-kanonischer Wnt Signalweg in die Migration der naszierenden Testes-Myotuben involviert sein. Zwei dieser nicht-kanonischen Signalwege sind als PCP Signalwege bekannt, da sie Zellpolaritäten steuern (Simons und Mlodzik, 2008). Die PCP Signalwege sind außerdem essentiell für die Migration vieler Zellen, so steuert das Kernmodul beispielsweise die „border cell“ Migration in Ovarien von *Drosophila* (Bastock und Strutt, 2007). Aus diesem Grund wurden die PCP Signalwege auf eine Beteiligung an der Migration der Testes-Myotuben hin untersucht.

##### **5.4.1 Das PCP Kernmodul reguliert möglicherweise die Zellpolarität der Testismuskeln**

Die Komponenten Stan, Vang, Pk sowie Dgo wurden für das PCP Kernmodul untersucht (Tab. 9). Stan konnte mithilfe eines spezifischen Antikörpers in Myoblasten und naszierenden Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles 30 h APF nachgewiesen werden (Abb. 18). Jedoch ist bei Immunfluoreszenz Analysen zu beachten, dass Antikörper nur begrenzt in Gewebe eindringen können bzw. die Eindringtiefe je nach Antikörper und Experiment variieren kann. Das ist beim Stan Antikörper auf Genitalscheiben 30 h APF sichtbar (Abb. 18), da die äußeren Bereiche der Zellen teilweise stärkere Signale aufweisen als die inneren.

Der RNAi-vermittelte knock-down von *pk* resultierte in Löchern in der Testismuskulatur Löcher sowie misorientierten Muskeln in der Hubregion (Abb. 19). Dieser Phänotyp kann auf schwache Zellpolaritäts- sowie Migrationsdefekte hinweisen. Pk interagiert mit Vang und wirkt antagonistisch auf Dgo, wodurch der Fz/Dsh-abhängige PCP Signal-

weg inhibiert wird (Jenny et al., 2005). Eine Herunterregulation von *pk* sollte demnach die inhibierende Wirkung reduzieren oder gar aufheben und den Fz/Dsh-abhängigen PCP Signalweg aktivieren. Wenn dieser Signalweg in Myoblasten aktiviert wurde, kann aus den beobachteten Defekten abgeleitet werden, dass der Signalweg die Migration der naszierenden Myotuben eher negativ beeinflusst. Das überrascht, da „border cells“ und Neuralleistenzellen sowie kollektiv migrierende Zellen in vielen weiteren Systemen in ihrer gerichteten Migration von den Komponenten des PCP Kernmoduls abhängig sind (Bastock und Strutt, 2007; Carmona-Fontaine et al., 2008; Seifert und Mlodzik, 2007).

Vermutlich ist die korrekte Regulation des PCP Kernmoduls in Testes-relevanten Myoblasten wichtig, um die Zellpolarität der Testes-Myotuben zu koordinieren, wie der durch *pk* knock-down hervorgerufene Phänotyp impliziert. Hierzu wurden jedoch keine weiteren Analysen durchgeführt.

## **5.5 MAP Kinasen regulieren die Migration verschiedener Zellen**

MAP Kinasen sind in verschiedene zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, sowie Zellmigration involviert (Shilo, 2014). Hierbei wird die Familie der MAPKs in drei Gruppen unterteilt, Erk/MAPK, p38 sowie JNK (Huang et al., 2004). In Vertebraten reguliert der p38-abhängige MAPK Signalweg die Migration glatter Muskeln in Lungentracheen (Hedges et al., 1999; Kotlyarov et al., 2002). Da außerdem die anderen MAPKs in Zellmigrationsprozessen beteiligt sind (Shilo, 2014), wurden MAPK Signalwege in Bezug auf eine mögliche Beteiligung an der Migration der Testes-Myotuben untersucht. Explizit wurde der Erk-MAPK-Signalweg hinsichtlich einer Aktivierung untersucht sowie die MAPKKKK Msn analysiert, da diese die Migration von Follikelzellen in Ovarien sowie den Dorsalschluss beeinflusst (Lewellyn et al., 2013; Su et al., 1998).

### **5.5.1 Die MAP Kinase Erk ist in naszierenden Myotuben vor sowie nach der Migration auf den Testis aktiviert**

Ein Antikörper gegen die aktivierte MAPK Erk wird häufig eingesetzt, um die Aktivierung von RTK Signalwegen nachzuweisen (Li et al., 2013; Lyulcheva et al., 2008). Da aktivierte MAPK Erk in Testes-relevanten Myoblasten sowie naszierenden Myotuben vor sowie kurz nach der Migration auf den Testis detektiert werden konnte, kann daraus geschlossen werden, dass RTK Signalwege, die die MAPK Erk ansteuern, während der Migration von Testes-Myotuben aktiviert sind. Interessanterweise war in dem unter den Testes-relevanten Myoblasten liegenden Epithel des sich entwickelnden Seminal Vesicles keine aktivierte MAPK Erk detektierbar (Abb. 22), was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des

Erk-MAPK Signalweges spezifisch in Testes-relevanten Myoblasten und Testes-Myotuben stattfindet und das Epithel den Liganden sekretieren könnte.

### 5.5.2 Misshapen reguliert die Migration der Testes-Myotuben sowie die Anordnung der F-Aktin Filamente in Testismuskeln

Die Ergebnisse der RT-PCRs (Tab. 12) sind der erste Indikator für eine Expression von *Msn* in Testes-relevanten Myoblasten bzw. Myotuben und somit mögliche Beteiligung an der Migration der Testes-Myotuben.

Eine der beiden untersuchten *msn*-RNAi Linien (v101517) wurde bereits als funktionell veröffentlicht (Lewellyn et al., 2013), weshalb alle weiterführenden Analysen mit dieser Linie durchgeführt wurden. Muskelspezifische Expression dieser RNAi führte zu misorientierten Testismuskeln und einer von Muskeln unbedeckten Hubregion sowie morphologischen Defekten (Tab. 13, Abb. 23). Misshapen wurde ursprünglich in Photorezeptoren von *Drosophila* identifiziert, wo eine *msn* Mutation die Morphologie und Orientierung der Photorezeptoren stark störte (Treisman et al., 1997). Die veränderte Zellmorphologie der naszierenden Testes-Myotuben bei 40 h APF (Abb. 23) in der *msn*-knock-down Situation deutet darauf hin, dass *Msn* in den Testes-Myotuben vergleichbar zu den Photorezeptorzellen essentiell zur korrekten Form beiträgt, vermutlich über Komponenten des Cytoskeletts.

Spätere Studien zeigten eine Beteiligung von *Msn* an verschiedenen Zellmigrationsprozessen in der Entwicklung von *Drosophila*. In Ovarien ermöglicht *Msn* die Migration von Follikelzellen, indem es Integrin-Level reduziert (Lewellyn et al., 2013). *Msn* ist während des Dorsalschlusses essentiell, damit Aktin und Myosin II in den epidermalen Zellen richtig lokalisieren und sich die Zellen somit verengen, Mutationen von *msn* führen zu Dorsalschluss-Defekten (Köppen et al., 2006; Su et al., 1998).

RNAi-vermittelte knock-downs der regulatorischen leichten Kette von Myosin II, Spaghetti squash (*Sqh*) (Karess et al., 1991), sowie der schweren Kette von Myosin II, Zipper (*Zip*) (Mansfield et al., 1996), resultierten in kleineren Testes mit nur 1,5 Umdrehungen und verdickten Testisspitzen. Die Testismuskeln erschienen kürzer als im Wildtyp und bedeckten den Testisschlauch nicht vollständig, sondern bildeten ein Netz mit vielen Löchern (K. Fritzen, persönliche Kommunikation). Bezugnehmend zur Regulation von Aktin und Myosin II während des Dorsalschlusses, könnte *Msn* auch in naszierenden Testes-Myotuben das Aktin Cytoskelett und Myosin II Komponenten wie *Sqh* und *Zip* ansteuern und damit die Migration der Testes-Myotuben regulieren. *Msn* ist an vielen weiteren Signalwegen beteiligt, was die unterschiedlichen Phänotypen des *msn*-, *sqh*- und *zip*-knock-down erklären



könnte. Einige der Signalwege in *Drosophila*, die vermutlich von Msn angesteuert werden, sind der JNK-abhängige MAPK Signalweg (Su et al., 1998), der Notch-Signalweg (Mishra et al., 2015), der Warts-Yorkie-Signalweg (Li et al., 2014) sowie das PCP Kernmodul, wo Msn als Effektor Fz nachgeschaltet ist (Paricio et al., 1999). Auch wenn die aufgeführten Signalwege in den unterschiedlichsten Systemen untersucht wurden, zeigen sie doch, dass Msn in viele verschiedene Signalwege eingreifen und somit Zellen auf unterschiedlichste Arten beeinflussen kann. Eine Wirkung von Msn im PCP Kernmodul in Testes-Myotuben ist eine mögliche Erklärung für die misorientierten Testismuskeln nach *msn* Herunterregulation.

### 5.5.3 Misshapen scheint die Expression von Cadherin-N nicht direkt zu beeinflussen

Die Differenzierung der Testes-relevanten Myoblasten in FC-artige und FCM-artige Zellen ist nicht von Msn abhängig (Abb. 24). Trotz herunterreguliertem *msn* war die aktivierte MAPK Erk in naszierenden Myotuben auf auswachsenden Seminal Vesicles detektierbar (Abb. 24). Der Antikörper erkennt die doppelt phosphorylierte Form der MAPK Erk (dpErk), jedoch weder eine Aktivierung von JNK noch p38 (Yung et al., 1997). Da bisher nur gezeigt wurde, dass Msn den JNK Signalweg ansteuert, ist die Detektion von dpErk in naszierenden Myotuben mit herunterreguliertem *msn* nicht weiter überraschend und ein Hinweis darauf, dass Msn Erk nicht ansteuert.

Im Gegensatz zu Duf und aktivierter MAPK war die CadN Expression nach muskelspezifischem *msn* knock-down stark reduziert (Abb. 24). Vermutlich ist die gestörte CadN Expression jedoch auf die veränderte Form und Orientierung der Testismuskeln zurückzuführen. Die einzelnen Muskeln lagen nicht mehr parallel nebeneinander, sondern übereinander und waren misorientiert. Die CadN Expression ist demnach nicht direkt vermindert, sondern die Adhäsionsstellen zwischen einzelnen Testismuskeln sind reduziert oder gestört.

Zusammengefasst deuten die Untersuchungen bezüglich Msn darauf hin, dass die Kinase für eine korrekte Anordnung der F-Aktin Filamente in Testismuskeln benötigt wird. Zusätzlich ist Msn wichtig für die korrekte Migration der Testes-Myotuben in Richtung Testisspitze. Welche Signalwege an der Migration beteiligt sind, sowie welche Signale die MAPK Erk in naszierenden Myotuben aktivieren, war Bestandteil weiterer Untersuchungen dieser Arbeit.

## 5.6 FGF Signalwege regulieren die Entwicklung der Reproduktionsorgane in *Drosophila*

Während der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane in *Drosophila* rekrutiert der FGFR Btl larvale mesodermale Zellen auf die Genitalscheibe (Ahmad und Ba-

ker, 2002). Der andere FGFR, Htl, reguliert die Entwicklung der Muskulatur der Ovarien (Irizarry und Stathopoulos, 2015). Da Htl und Btl auch in weiteren Zellmigrationsprozessen benötigt werden (Gisselbrecht et al., 1996; Glazer und Shilo, 1991), sind die FGF Signalwege vielversprechende Kandidaten bei der Testes-Myotuben Migration. Vorherige Analysen des FGF Signalweges im Zuge einer Bachelorarbeit erbrachten keinen Hinweis auf eine Beteiligung an der Entwicklung der Testismuskulatur, jedoch wurde für RNAi-Analysen die Treiberlinie C855a-Gal4 verwendet (Wenzek, 2013). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Komponenten der FGF Signalwege noch einmal bezüglich einer Beteiligung an der Migration von Testes-Myotuben untersucht.

### 5.6.1 Stumps könnte die MAPK Erk in naszierenden Testes-Myotuben ansteuern

Das intrazelluläre FGF-Adapterprotein Stumps ist bei 24 h APF in FC-artigen Myoblasten exprimiert und co-lokalisiert bei 30 h APF mit der aktivierten MAPK Erk in naszierenden Myotuben (Abb. 25). Allerdings ist beim Stumps Antikörper zu beachten, dass er die Expression des Adapterproteins widerspiegelt, jedoch keine Aussage über die Phosphorylierung und somit Aktivierung von Stumps zulässt. Stumps ist nur in Zellen exprimiert, die auch FGFRs exprimieren (Vincent et al., 1998). Daher ist die Detektion des Adapterproteins in naszierenden Myotuben vor und nach der Migration auf den Testis ein Hinweis darauf, dass ein FGF Signalweg während der Migration in naszierenden Myotuben benötigt wird. Die Co-Lokalisation mit der aktivierten MAPK Erk deutet auf eine Aktivierung des FGF Signalweges hin. Ob Erk die einzige MAPK ist, die möglicherweise in naszierenden Testes-Myotuben über Btl und/oder Htl und Stumps angesteuert wird, sollte mithilfe weiterer Analysen untersucht werden.

### 5.6.2 Heartless wird benötigt, um den Testis mit Muskeln zu besiedeln

Da die muskelspezifische Herunterregulation des FGFRs Btl keine offensichtlichen Defekte der Testismuskulatur hervorrief (Abb. A33), wurde bei den weiteren Analysen zur Migration auf Htl konzentriert. Durch *htl* knock-down konnten drei Phänotypen hervorgerufen werden, die möglicherweise einander bedingen (Abb. 26). Einerseits waren alle adulten Testes erheblich verkleinert, nicht elongiert und wiesen keine Verbindung zum Seminal Vesicle auf. Außerdem waren keinerlei Muskeln in der Testishülle vorhanden, was entweder auf einen starken Migrationsdefekt hindeutet oder auf einen frühen Defekt während der Determination der Testes-relevanten Myoblasten auf der Genitalscheibe. Der dritte beobachtete Effekt war dementsprechend das Fehlen großer Mengen von Myoblasten auf Genitalscheiben 24 h APF. Hierbei war auffällig, dass vor allem die Myoblasten in posterioren Bereichen der

Genitalscheibe fehlten, die Testes-relevanten Myoblasten auf den auswachsenden Seminal Vesicles jedoch bei 24 h APF vorhanden waren. Das Fehlen der posterior gelegenen Myoblasten könnte an einer reduzierten Proliferation der Myoblasten liegen oder auf eine Htl-abhängige Rekrutierung der Myoblasten auf die Genitalscheibe.

Bei muskelspezifisch herunterreguliertem *htl* waren die Testes-relevanten Myoblasten bei 24 h APF vorhanden, auswachsende Seminal Vesicles 30 h APF wiesen allerdings eine sehr stark reduzierte Menge an Myotuben auf, bis hin zum völligen Fehlen der Testes-Myotuben auf den auswachsenden Seminal Vesicles (Abb. 26). Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Möglicherweise durchlaufen die Testes-Myotuben Apoptosen, wenn sie kein Signal zur Migration empfangen können. Es wäre auch denkbar, dass die Apoptosen der Testes-Myotuben durch irgendein unbekanntes Signal ausgelöst werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Testes-Myotuben mit der Migration von den auswachsenden Seminal Vesicles beginnen, jedoch das anlockende Signal nicht empfangen können und somit nicht auf den pupalen Testes ankommen. Hierbei könnte *Ths* oder *Pyr* das anlockende Signal sein, das an Htl in Testes-Myotuben bindet. Erschwerend kommt hinzu, dass die fehlende Verbindung zwischen Seminal Vesicle und Testis auch die Migration stören kann, wodurch der mithilfe des *htl* knock-downs produzierte Migrationsdefekt nur ein sekundärer Effekt wäre. Für eine Beteiligung von Htl an der Migration der Testes-Myotuben spricht der knock-down mithilfe einer weiteren, unveröffentlichten *htl*-RNAi Linie, der zu Migrationsdefekten führt (Abb. A31). Dennoch sollten hierzu weitere Analysen durchgeführt werden.

Das Adapterprotein Stumps war trotz des *htl* knock-downs in FC-artigen Myoblasten exprimiert (Abb. 26), der FGF Signalweg könnte also prinzipiell in den Myoblasten aktiviert werden. Die Aktivierung der MAPK Erk war ebenfalls normal in naszierenden Testes-Myotuben detektierbar (Abb. 26). Das könnte bedeuten, dass *htl* nicht komplett herunterreguliert wurde, oder dass weitere Signalwege die MAPK Erk aktivieren.

Die Herunterregulation der Liganden *pyr* und *ths* in Muskeln führte im Gegensatz zum knock-down ihres Rezeptors *htl* nicht zu starken Migrationsdefekten (Abb. A29, A30). Der *pyr* knock-down brachte jedoch Testes mit einer von Muskeln unbedeckten, vergrößerten Spitze hervor, was auf eine Störung der Testes-Myotuben Migration hindeuten könnte. Beide RNAi-Linien sind als funktionell veröffentlicht (*ths* (v24536): Franzdóttir et al., 2009; Sen et al., 2011; *pyr*: Irizarry und Stathopoulos, 2015), daher würde man erwarten, dass sie *ths* bzw. *pyr* effektiv herunterregulieren. Da man Liganden und Rezeptor jedoch nicht unbedingt in einer Zelle erwarten würde, ist es nicht überraschend, dass der muskelspezifische *ths* knock-

down keinen Effekt hat. Die scheinbaren Migrationsdefekte durch *pyr* Herunterregulation können auf sekundäre Effekte der RNAi-Linie zurückzuführen sein, da für diese Linie viele Off-targets vorhergesagt sind (VDRC, Dietz et al., 2007). Sie könnten allerdings auch bedeuten, dass *Pyr* ebenso wie vermutlich *Htl* und *Stumps* in Testes-Myotuben exprimiert wird und es somit zu einem autokrinen FGF Signal kommt. Ein autokriner FGF Signalweg, also die Expression des Liganden und des Rezeptors in derselben Zelle, wurde unter anderem in der Entwicklung der Skelettmuskulatur von Mäusen gezeigt (Hannon et al., 1996). Bezüglich der Frage nach einem autokrinen FGF Signal in Testes-Myotuben könnten weitergehende Analysen Klarheit bringen, um den Mechanismus ihrer Migration zu verstehen.

### 5.6.3 *Stumps* ist essentiell für die Migration der Testes-Myotuben in Richtung Testisspitze

Das Adapterprotein *Stumps* rief bei muskelspezifischer Herunterregulation ähnliche, wenn auch deutlich schwächere Muskeldefekte als der *htl* knock-down hervor (Abb. 27). Das Vorhandensein von einigen glatten Muskeln auf adulten Testes sowie naszierenden Myotuben auf pupalen Testes 40 h APF impliziert, dass die Myotuben initial die Migration von den auswachsenden Seminal Vesicles auf die Testes beginnen und dort auch ankommen.

Die vorhandenen Testismuskeln wiesen dort, wo sie parallel aneinandergrenzten, *CadN* in der Membran auf (Abb. 27), was dafürspricht, dass die Muskeln prinzipiell wildtypische Eigenschaften aufweisen und nur die Migration gestört ist. Überraschenderweise schien die Aktivierung der MAPK Erk durch den *stumps* knock-down nicht beeinträchtigt zu sein. In trachealen und mesodermalen Zellen ist *Stumps* der Link zwischen aktiviertem FGFR und der MAPK Erk (Vincent et al., 1998). Während der Gastrulation geht in *stumps* Mutanten die Aktivierung der MAPK in migrierenden mesodermalen Zellen verloren (Michelson et al., 1998). Wenn *Stumps* in Testes-Myotuben ebenfalls die Aktivierung des FGFR auf die MAPK Erk überträgt, könnte die Aktivierung von Erk in Abwesenheit von *Stumps* bedeuten, dass noch weitere RTK Signalwege in Testes-Myotuben aktiv sind.

Vergleichbar zum *htl* knock-down wiesen auch einige Genitalscheiben mit muskelspezifisch herunterreguliertem *stumps* bei 24 h APF keine posterior gelegenen Myoblasten auf (Abb. A36). Da auf einem Großteil der untersuchten Genitalscheiben diese Myoblasten jedoch vorhanden waren, ist die Abwesenheit der Myoblasten vermutlich auf eine sehr starke *stumps* Herunterregulation zurückzuführen. Wie bereits für *Htl* thematisiert, könnten auch in diesem Fall die fehlenden posterior gelegenen Myoblasten ein Hinweis auf verminderte Proliferation oder Rekrutierungsdefekte sein.

Die muskelspezifische Herunterregulation von *csw* resultierte teilweise in Löchern zwischen einzelnen Testismuskeln (Tab. 14, Abb. A34). Da Csw bei einer Aktivierung des FGF Signalweges an Stumps bindet, ist es überraschend, dass keine zum *stumps* knock-down vergleichbaren Migrationsdefekte produziert wurden. Dies kann jedoch an der Effizienz der RNAi-Linie liegen, da keine der verwendeten *csw*-RNAi Linien bisher veröffentlicht wurde und daher nicht sicher ist, ob oder wie effizient *csw* herunterreguliert wird.

#### **5.6.4 Breathless könnte zur Induktion der Fusion von Testes-relevanten Myoblasten beitragen**

Weder der muskelspezifische knock-down von *bnl* noch von dessen Rezeptor *btl* produzierten offensichtliche Defekte der Testismuskulatur (Abb. A32, A33). Statt Migrationsdefekten konnten bei muskelspezifischer Herunterregulation von *bnl*, *btl* sowie *csw* jedoch Fusionsdefekte festgestellt werden. Trotz der Verstärkung des RNAi-Effektes durch Dcr-2 waren die durchschnittlichen Kernzahlen gegenüber den Kontrollen nur wenig vermindert, sodass alle Fusionsdefekte als schwach eingestuft wurden. Dennoch sind die schwachen Fusionsdefekte glaubhaft, da Bnl der Ligand von Btl ist und Csw unterhalb von Btl in der Signalkaskade liegt. Die Ergebnisse würden implizieren, dass ein von Bnl angesteuerter Btl-abhängiger FGF Signalweg die Fusion der Testes-relevanten Myoblasten auf den auswachsenden Seminal Vesicles beeinflusst, vermutlich eher in Form einer möglichen Induktion der Fusion als einer Repression.

#### **5.6.5 Einordnung der Ergebnisse zum FGF Signalweg**

Die Ergebnisse der Analysen der FGF Signalwege sprechen dafür, dass die Komponenten der Signalwege essentiell für die Entwicklung der multinukleären Testismuskulatur sind. Hierbei würde ein Htl-abhängiger FGF Signalweg über Stumps und weitere Komponenten die Migration der naszierenden Testes-Myotuben auf die Testes sowie auf dem Testis in Richtung apikaler Spitze regulieren. Tatsächlich würde ein Htl-abhängiger FGF Signalweg in diesem Fall die Migration und Entwicklung der Muskeln in männlichen sowie weiblichen Reproduktionsorganen von *Drosophila* beeinflussen, da auch in Ovarien Htl für die Migration der Zellen sowie die Ausbildung der Ovarienmuskeln benötigt wird (Irizarry und Stathopoulos, 2015).

Interessanterweise deuten die Daten darauf hin, dass beide FGFRs von *Drosophila* in Testes-relevanten Myoblasten bzw. naszierenden Testes-Myotuben benötigt werden, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung. Da der Btl-abhängige FGF Signalweg möglicherweise zur Induktion der Fusion von Testes-relevanten Myoblasten beiträgt, würden



Btl und Bnl ab ca. 28 h APF benötigt (Kuckwa et al., 2016), Htl und Ths/Pyr ab ca. 30 h APF zum Beginn der Migration. Da abgesehen von den Liganden und Rezeptoren alle Komponenten in den Signalwegen übereinstimmen, wäre allerdings fraglich, wie innerhalb der Testes-relevanten Myoblasten zwischen einem Fusions- und einem Migrationssignal unterschieden werden kann. Möglicherweise sind also nicht alle Komponenten gleich, je nachdem ob Btl oder Htl aktiviert wird, oder ein einkerniger Myoblast reagiert anders auf die Signale als eine mehrkernige Myotube, nämlich mit Förderung der Fusion statt der Migration. Wenn es eine solche zeitliche oder Kernzahl-abhängige Unterscheidung in der Zellantwort geben sollte, wäre der Wechsel zwischen Btl und Htl als Rezeptor eine sehr effiziente Lösung, um zwei verschiedene Mechanismen in der Entwicklung der Testismuskulatur mithilfe derselben oder nahezu derselben Komponenten zu steuern.

## **5.7 Es konnten erfolgreich *ex vivo* Co-Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes etabliert werden**

### **5.7.1 Kulturen von Genitalscheiben können deren Entwicklung zeigen**

Zur Verfolgung der Migration der naszierenden Testes-Myotuben wurden *ex vivo* Co-Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes etabliert. Genitalscheiben und pupale Testes von 8 h APF bis 40 h APF zeigten Wachstum in den Co-Kulturen (Abb. A37, 28, 29).

Je nach Alter zum Startzeitpunkt verlief die *ex vivo* Entwicklung unterschiedlich ausgeprägt. Genitalscheiben 8 h APF erschienen nach 12 Stunden in Kultur tatsächlich wie eine bei etwa 20 APF präparierte, die Entwicklung *ex vivo* war also scheinbar mit der *in vivo* Situation vergleichbar. Bei Genitalscheiben 16 h APF war auch eine Weiterentwicklung *ex vivo* sichtbar (Abb. 28), jedoch erschien sie nach 8 Stunden in Kultur nicht genausoweit entwickelt wie eine bei 24 h APF präparierte Genitalscheibe. Das spricht für eine verzögerte Entwicklung in der Kultur gegenüber der *in vivo* Situation. Die verzögerte Entwicklung könnte für eine Beteiligung verschiedener Signalwege an der Entwicklung und dem Auswachsen der Genitalscheibe sprechen, da sekretierte Liganden im Medium stark verdünnt werden. Die Signalwege könnten dementsprechend nicht wie in der Puppe aktiviert werden, weil das umliegende Gewebe in der Kultur fehlt. Bei allen Zeitangaben ist außerdem zu beachten, dass das angegebene Alter bis zu zwei oder drei Stunden abweichen kann, da allein das Stadium der weißen Vorpuppe zwei Stunden dauert (Bainbridge und Bownes, 1981). Dennoch kann die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Co-Kultur die *in vivo* Prozesse wahrscheinlich annähernd wiedergeben.

Das hierbei eingesetzte Medium enthält Ecdyson und wurde erfolgreich zur Verfol-

gung der Evagination der Flügelimaginalscheibe mithilfe von „live imaging“ eingesetzt (Aldaz et al., 2010). Das für Testes-Kulturen etablierte Kulturmedium (Gärtner et al., 2014) konnte nicht verwendet werden, da die Genitalscheiben sich in diesem Medium nicht weiterentwickelten, vermutlich aufgrund des fehlenden Ecdysons. Dass die Spermatogenese jedoch trotzdem weiter ablief, ließ sich daran erkennen, dass nach einigen Stunden in Kultur die pupalen Testes platzten, da der Druck der sich entwickelnden Keimzellen zu groß wurde.

### 5.7.2 **Stumps ist essentiell für die Migration der naszierenden Myotuben in Richtung Testisspitze**

Obwohl die Migration der naszierenden Testes-Myotuben auf die pupalen Testes *ex vivo* nicht verfolgt werden konnte, war es dennoch möglich, die Migration auf den Testes in Richtung Testisspitze zu beobachten. Auf Testes, die 40 h APF in Kultur genommen wurden, waren bereits naszierende Myotuben vorhanden, die im Verlauf von neun Stunden in Richtung apikaler Spitze migrierten (Abb. 29). Die naszierenden Myotuben schwärmten aus und versuchten den Testis zu bedecken, jedoch war nur noch eine Verbindung zu einem kleinen Teil des Seminal Vesicles vorhanden, wodurch keine oder zu wenige neue naszierende Myotuben auf die Testes wanderten. Daher bildeten die Myotuben eine Art Netz um den Testis, phänotypisch vergleichbar zur netzartigen Testismuskulatur nach muskelspezifischem *arm* knock-down (Abb. 14). Das würde bedeuten, dass aufgrund der Herunterregulation von *arm* in Muskeln nicht genug Myotuben auf die Testes gewandert sind.

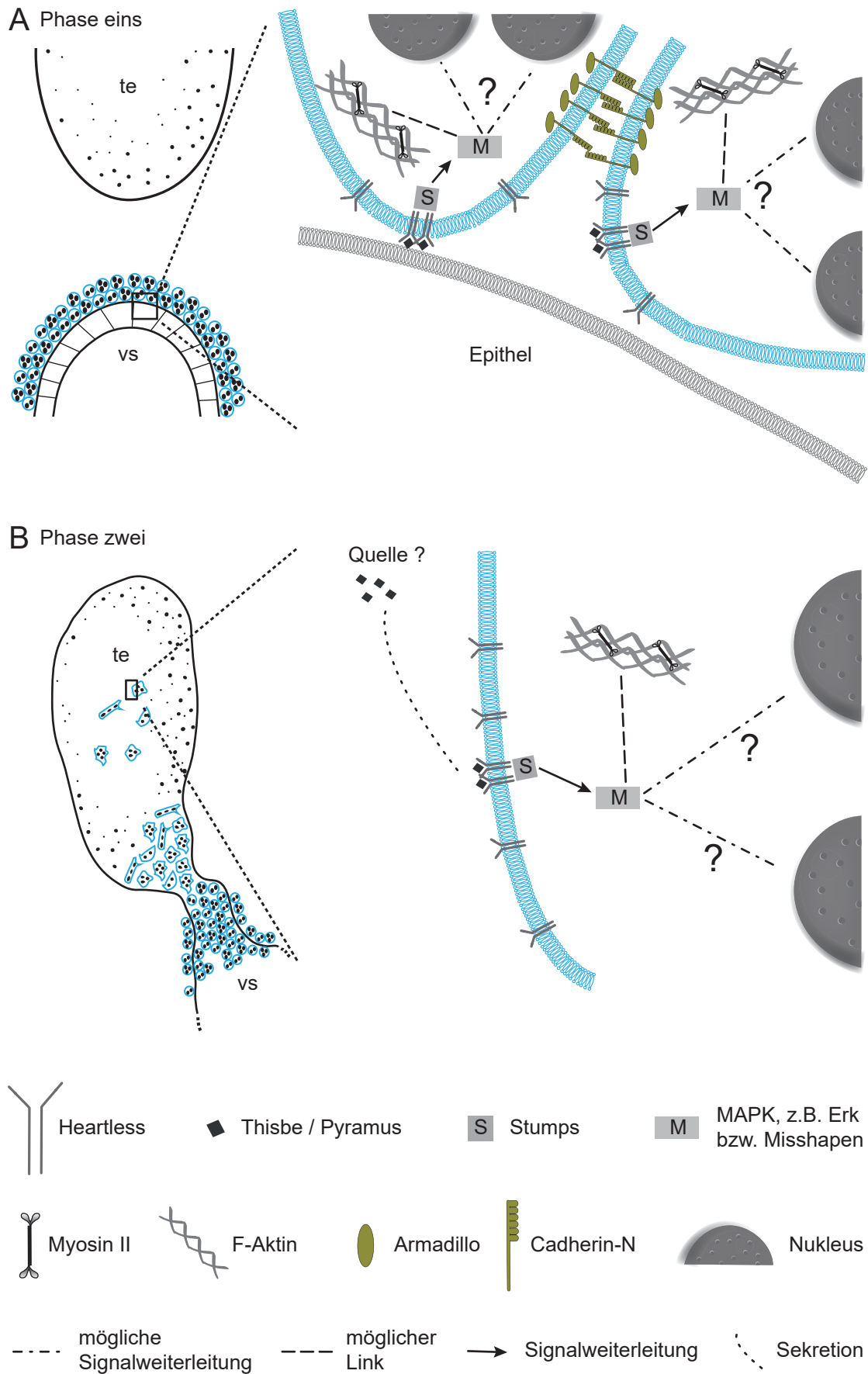
Die Migration der naszierenden Testes-Myotuben konnte mithilfe eines muskelspezifischen *stumps* knock-downs gestört werden. Die *ex vivo* Kulturen zeigten, dass bei herunterreguliertem *stumps* die naszierenden Myotuben weniger weit sowie weniger schnell migrierten (Abb. 29). Dieses Experiment zeigt, dass *Stumps* nicht essentiell für die initiale Migration der naszierenden Testes-Myotuben auf den Testes ist, jedoch einen großen Anteil an der Migration Richtung Testisspitze hat. Außerdem zeigt es, dass die normale und gestörte Migration verfolgt werden kann und Unterschiede sichtbar sind. Hierbei ist jedoch fraglich, ob schwache Migrationsdefekte ebenfalls auf diese Weise untersucht werden könnten.

## 5.8 **Zusammenfassendes Modell**

Zusammengefasst kann mithilfe der hier diskutierten Ergebnisse ein Modell aufgestellt werden, das die Migration der naszierenden Testes-Myotuben in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase erfolgt die initiale Migration der naszierenden Myotuben von dem auswachsenden Seminal Vesicle auf den Testis. Die zweite Phase umfasst die weitere Migration der naszierenden Myotuben in Richtung apikaler Testisspitze und die gleichzeitige Formgebung

der Testisschläuche (Abb. 30).

Da weitere naszierende Myotuben von dem auswachsenden Seminal Vesicle auf den



**Figure 30: Die Migration der naszierenden Myotuben kann in zwei Phasen unterteilt werden, die vom Heartless-abhängigen FGF Signalweg gesteuert werden.** In Phase eins migrieren die naszierenden Myotuben als Zellverbund vom auswachsenden Seminal Vesicle auf den Testis. Ein Htl- und Stumps-abhängiger FGF Signalweg aktiviert die MAPK Kaskade und somit Erk oder möglicherweise Msn, die das Cytoskelett über Myosin II ansteuern könnte. CadN und Arm vermitteln die Zelladhäsion zwischen naszierenden Myotuben und die Kontinuität des Zellverbundes (A). In der zweiten Phase migrieren die naszierenden Myotuben zwar einzeln in Richtung Testisspitze, jedoch könnte auch hier ein Htl-abhängiger FGF Signalweg Msn oder Erk und das Cytoskelett ansteuern (B). Nach einer initialen Phase eins laufen beide Phasen gleichzeitig ab, bis alle Myotuben auf dem Testis angekommen sind (modifiziert nach Kuckwa et al., 2016).

Testis migrieren, laufen nach einer initialen Phase eins beide Phasen parallel zueinander ab, bis die endgültige Anzahl an Myotuben den Testis erreicht hat.

In Phase eins des Modells (Abb. 30 A) bindet Ths und/oder Pyr an den FGFR Htl in naszierenden Myotuben, die an das Epithel des sich entwickelnden Seminal Vesicles angrenzen. Hierdurch wird der FGF Signalweg über das Adapterprotein Stumps aktiviert. Stumps nachgeschaltet sind Komponenten der MAPK Kaskade, wie beispielsweise Msn oder Erk, die aktiviert werden und die Transkription verschiedener Zielgene beeinflussen können. Msn oder Erk könnte möglicherweise auch Komponenten des Aktin Cytoskeletts ansteuern wie Myosin II und damit den Migrationsprozess der naszierenden Myotuben vorantreiben. CadN und Arm sind in naszierenden Myotuben auf der Genitalscheibe exprimiert und könnten die Myotuben in einem Zellverbund zusammenhalten, weshalb die erste Phase vermutlich eine kollektive Zellmigration darstellt.

In der zweiten Phase dieses Modells (Abb. 30 B) migrieren die naszierenden Myotuben, die bereits auf dem Testis angekommen sind, weiter in Richtung Testisspitze. Da CadN nicht mehr vorhanden ist und Arm diese Phase nicht beeinflusst, migrieren die naszierenden Myotuben in der zweiten Phase vermutlich als einzelne Zellen statt im Verbund. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der *ex vivo* Kulturen. Diese Migration wird vermutlich, vergleichbar zu Phase eins, durch den FGF Signalweg reguliert.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben erste Einblicke in die Htl-abhängige Regulation der Migration naszierender Testes-Myotuben auf den Testis sowie auf dem Testis in Richtung Spitze. Hierbei scheint auch die Verbindung zwischen dem sich entwickelnden Seminal Vesicle und dem pupalen Testis eine Rolle zu spielen. Msn oder Erk könnte über Transkriptionsregulation verschiedener Zielgene oder über einen möglichen Link zu Myosin II die Migration vorantreiben. In dieser Arbeit wurden erstmals Einblicke in die Regulation der Migration naszierender Myotuben von der Genitalscheibe auf die Testes gewonnen. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch nötig, um die Migrationsprozesse während der Entwicklung der Testismuskulatur zu verstehen.

## 6. Ausblick

Zum besseren Verständnis der Migration der naszierenden Testes-Myotuben während der Entwicklung der Testismuskulatur sind noch vielfältige Untersuchungen möglich. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalwege sind teilweise stark miteinander vernetzt und es ist möglich, dass der Htl-abhängige FGF Signalweg nicht allein die Migration der naszierenden Testes-Myotuben steuert.

Bei der weiteren Suche nach Treiberlinien wäre eine, die spezifisch die Expression ab ca. 26 h oder 28 h APF in Testes-relevanten Myoblasten und naszierenden Myotuben treibt, die beste Möglichkeit, um Komponenten herunter zu regulieren, die an der Migration der Testes-Myotuben ab ca. 30 h APF beteiligt sind. Bevor allerdings ein so distinkt exprimiertes Protein gefunden wurde, ist es unwahrscheinlich, dass eine solche Treiberlinie identifiziert werden kann.

Bezüglich der nicht-kanonischen Wnt Signalwege wäre es sinnvoll, weitere Komponenten des Kernmoduls wie Frizzled und Dishevelled zu untersuchen sowie die bereits beobachteten Phänotypen näher zu charakterisieren. Auch Fat und Dachous sollten untersucht werden. Zusätzlich zu den RNAi-Untersuchungen oder wenn keine RNAi-Linien verfügbar sind, könnten evtl. Mutanten auf Defekte der Testismuskulatur analysiert werden.

Auch die MAP Kinase Kaskade mit den MAPKs JNK, Erk und p38 bedarf weiterer Untersuchungen. Da Erk in naszierenden Myotuben während der Migration auf die Testes aktiviert zu sein scheint, wäre es sinnvoll, die Kinase sowie mögliche nachgeschaltete Proteine zu untersuchen. Interessanterweise wird in Maus-Fibroblasten Fak von Erk phosphoryliert (Hunger-Glaser et al., 2003), daher wäre eine genauere Untersuchung von Fak mit einem geeigneteren Treiber sinnvoll. Da Erk außerdem über die Kinase MLCK Myosin II ansteuern und somit die Zellmigration von Fibroblasten beeinflussen kann (Totsukawa et al., 2004; Webb et al., 2004), sollte Erk auch in naszierenden Testes-Myotuben hinsichtlich einer Verbindung zu Myosin II untersucht werden.

Erk sowie JNK können unter anderem über Epidermal Growth Factor (EGF) Signalwege aktiviert werden (Huang et al., 2004). Da auch Msn den JNK Signalweg ansteuern kann, sollten der EGF Signalweg sowie JNK und weitere Komponenten mithilfe von RNAi-vermittelten Herunterregulationen analysiert werden. Falls ähnliche Phänotypen zum *msn* knock-down produziert würden, könnte der EGF Signalweg in naszierenden Testes-Myotuben Msn und somit indirekt JNK ansteuern und dadurch die Migration der Testes-Myotuben regulieren. Zur Detektion aktivierter JNK gibt es außerdem einen Antikörper (Chittaranjan



et al., 2015), den man zur Untersuchung des JNK-Status in naszierenden Testes-Myotuben sowie zur Überprüfung von RNAi-Linien verwenden könnte. Msn selbst könnte auch mithilfe eines spezifischen Antikörpers (Houalla et al., 2005; Köppen et al., 2006) genauer untersucht werden. Mithilfe des Antikörpers könnte die Expression in naszierenden Testes-Myotuben sowie die Funktionalität der RNAi-Linie überprüft werden.

Die MAPK p38 kann ebenso wie Erk vom FGF Signalweg aktiviert werden (Huang et al., 2004). Da auch p38 über verschiedene Komponenten das F-Aktin Cytoskelett beeinflussen und Zellmigrationen steuern kann (Benndorf et al., 1994), sollte diese Kinase bei der weiteren Untersuchung der MAPK Kaskade nicht außer Acht gelassen werden.

Viele Inhibitoren für jede der drei MAP Kinasen Erk, JNK und p38 sind käuflich erhältlich. Es wäre sinnvoll, die Inhibitoren in *ex vivo* Co-Kulturen mit pupalen Testes 40 h APF einzusetzen, um zu evaluieren, welche MAPK die Migration der naszierenden Myotuben in Richtung Testisspitze reguliert bzw. welche Kinasen hierbei zusammenwirken.

Da auch der kanonische Wnt Signalweg möglicherweise eine Rolle bei der Migration einnehmen könnte, sollten auch bereits in der Literatur für *Drosophila* beschriebene Inhibitoren in *ex vivo* Kulturen eingesetzt werden, so beispielsweise Ionomycin (Akiyoshi et al., 2014; Park et al., 2005) oder 6-bromoindirubin-3-oxime (BIO) als Inhibitor bzw. Aktivator des kanonischen Wnt Signalweges (Akiyoshi et al., 2014; Kehn-Hall et al., 2011).

Die Signalwege, die möglicherweise die Migration der naszierenden Testes-Myotuben beeinflussen, sind so komplex und vermutlich miteinander verschachtelt, sodass diese Arbeit nur einen ersten Einblick in eine mögliche Regulation bieten kann. Weitergehende Analysen sind dringend nötig, um die Migrationsprozesse und somit die Entwicklung der Testismuskulatur besser verstehen zu können.

## 7. Material

### 7.1 Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

AppliChem, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, St. Louis

Thermo Fisher Scientific, Waltham

### 7.2 Verwendete Geräte

#### 7.2.1 Mikroskope

Binokular

Stemi DV4, Zeiss, Jena

Stemi SV11, Zeiss, Jena

Stemi SV2000-C, Zeiss, Jena

Fluoreszenzmikroskop

AxioObserver Z.1 inverses Mikroskop mit Apo-Tome, Zeiss, Jena

Lichtmikroskop

Axioskop, Zeiss, Jena

#### 7.2.2 Weitere Geräte

Eismaschine

AF-20, Scotsman

Gelelektrophoreseapparatur

Werkstatt der Philipps-Universität Marburg

Kreisschüttler

Typ 2005, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Magnetrührer

Combimac RCT, IKA, Staufen

Mikrowelle

Dimension 4, Panasonic

NanoDrop

2000 Spectrophotometer, Waltham, MA

PCR-Maschine

Personal Cycler, Biometra, Göttingen

pH-Meter

pH211, Hanna Instruments, Kehl am Rhein

Photometer

Gene Quant 1300, GE Healthcare, Freiburg

Schüttler

Rexa 2000, Heidolph, Schwabach

Schüttler zur Inkubation

WT-12, Biometra, GFL 3005/3033, Burgwedel

Spannungsquelle

Power Pack 300, BioRad; Hercules

Thermoblock

HBT 130, Haep Labor Consult, Bovenden

Thermoprinter

P93, Biometra

UV-Transilluminator

Ultralum, Electronic Dual-Light-Transilluminator

UV-Gel-Dokumentation

CCD-Kamera Ultralum, Carson Californien

Vortexer

M51 Minishaker, IKA, Staufen

Wärmeschrank

Heraeus, Hanau

Wasserbad

Typ 1002, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

HAAKE C10, HAAKE, Karlsruhe

Zentrifugen

Biofuge pico, Heraeus, Hanau

Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau

### 7.3 Antibiotika

Ampicillin-Stocklösung

100 mg/ml, Roth, Karlsruhe

Chloramphenicol-Stocklösung	34 mg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim
Penicillin-Streptomycin-Stocklösung	100x, PAA, Cambridge

#### 7.4 Enzyme

20-Hydroxy-Ecdyson	Sigma-Aldrich, St. Louis
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Elastase	Sigma-Aldrich, St. Louis
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Ipswich
RNase A	Boehringer Ingelheim
SP6 RNA Polymerase	Roche Diagnostics, Rotkreuz
T7 RNA Polymerase	Roche Diagnostics, Rotkreuz
Taq DNA Polymerase	Axon, Kaiserslautern

#### 7.5 Kits und Sonstiges

2-Log DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich
Cell Dissociation Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis
DIG RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics, Rotkreuz
DIG RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics, Rotkreuz
Dynabeads® Mouse CD8 (Lyt 2)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Fluoromount G™	Southern Biotech, Birmingham
Genomed Jetstar Midi Kit 2.0	Genomed, Löhne
Kulturschälchen µ-Dish <sup>35mm, high</sup> tissue culture treated	ibidi, Martinsried
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen, Venlo
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Venlo
pCR®II-TOPO® Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RNAqueous®-Micro total RNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Shields and Sang M3 Insect Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis
Whatman® Paper	Sigma-Aldrich, St. Louis

#### 7.6 Puffer und Lösungen

DIGI	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl
DIGIII	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>
DNA Ladepuffer (6x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylen- cyanol, 0,9 % (w/v) Borsäure, 40 % (w/v) Glycerin in TBE
E1-Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ ml RNase A
E2-Lysepuffer	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
E3-Neutralisierungspuffer	3,2 M KaAc/Essigsäure (pH 5,5)
E4-Equilibrierungspuffer	600 mM NaCl, 100 mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0), 0,15 % (v/v) Triton X-100

SILKE FENDER	MATERIAL
E5-Waschpuffer	800 mM NaCl, 100 mM NaAc/Essigsäure (pH 5,0)
E6-Elutionspuffer	125 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
Ethidiumbromid Lösung	10 µg/ml
Färbelösung <i>in situ</i> Hybridisierung	3,5 µl NBT, 3,5 µl BCIP, 0,1 % Tween 20, ad 1 ml DIGIII
Färbelösung Spot-Test	4,5 µl NBT, 3,5 µl BCIP, ad 1 ml DIGIII
F-PBS	3,7 % (w/v) Formaldehyd in 1x PBS
F-PBT	3,7 % (w/v) Formaldehyd in 1x PBT
Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml Lachssperma DNA, 0,1 % Tween 20
PBS, 10x	130 mM NaCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O, pH 7,4
PBT, 1x	0,1 % Tween 20 in PBS
PBSTD, 1x	0,3 % Triton X-100, 0,3 % Natriumdeoxycholat, in 1x PBS
TBE, 10x	89 mM Tris/HCl (pH 8.2), 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TE, 10x	100 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA

### 7.7 Nähr- und Kulturmedien für *Drosophila* und *Escherichia coli*

Maismehlagar	60 % (w/v) Maismehl, 7,15 % (w/v) Fructose, 1,2 % (w/v) Trockenhefe, 60 % (w/v) Malzextrakt, 0,14 % (w/v) Nipargin, 0,7 % Select Agar, 0,6 % (w/v) Propionsäure
Genitalscheiben-Kulturmedium	2 % Fetales Kälberserum, 0,5 % Penicillin-Streptomycin, 0,1 µg/ml Ecdyson, in Shields and Sang M3 Insect Medium (nach Aldaz et al., 2010)
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, 2 % Bacto-Agar für LB-Platten

### 7.8 Bakterienstämme

DH5α <i>Escherichia coli</i>	chemisch kompetente Zellen, <i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , F <sup>-</sup> , Φ80 <i>lacZ</i> , <i>ΔM15</i> , <i>Lamda</i> <sup>-</sup> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , (AG Renkawitz-Pohl, Universität Marburg)
------------------------------	---

### 7.9 Verwendete cDNAs

Alle verwendeten cDNAs wurden von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP, Berkeley, CA) bezogen.

Gen	cDNA	Vektor
<i>armadillo</i>	LD23131	pOT2
<i>arrow</i>	LP19005	pOT2
<i>focal adhesion kinase</i>	RE57482	pFLC-I
<i>naked cuticle</i>	LP04418	pOT2
<i>nemo</i>	AT14896	pOTB7

**7.10 Vektoren***pCRII-TOPO*

Vektor mit 3' überhängenden Thymidinen zur Klonierung von PCR-Produkten, Thermo Fisher Scientific, Waltham

**7.11 Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg synthetisiert.

**7.11.1 Sequenzierungsprimer****Primernamen**

M13 fwd

M13 rev

**Sequenz 5' – 3'**

GTAAAACGACGGCCAG

CAGGAAACAGCTATGAC

**7.11.2 Primer zur Sondenherstellung****Gen***frizzled2***Primernamen**

fz2RTsen

fz2RTas

**Sequenz 5' – 3'**

TCG TCC TCC TGC TGA CAT C

CAT TCT CTC CGG CCAT TCG

**7.11.3 Kontrollprimer für RT-PCR****Gen***alphaTub84B**tpl<sup>p4D</sup>**sgs5***Primernamen**

alphatub84B1fwd

alphatub84B1rev

tplRTsen

tplRTas

sgs5RTsen

sgs5RTas

**Sequenz 5' – 3'**

CAT AGC CGG CAG TTC GAA CG

GGA CCT CAT CGA CCA CAG TG

GAG TGC ATC ACG TGA ATG GG

GCC ACG CTG ATC CGC ATT C

TAG GAA CTA CCA ATG GGC TC

GAA GGG CCA ACA ATA GGA

**7.11.4 Primer für RT-PCR****Gen***APC-like**armadillo**arrow**Axin**dachsous**diego**DWnt2**DWnt3***Primernamen**

APClikeRTsen

APClikeRTas

armRTsen

armRTas

arrowRTsen

arrowRTas

axinRTsen

axinRTas

dachsousRTsen

dachsousRTas

diegoRTsen

diegoRTas

DWnt2RTsen

DWnt2RTas

DWnt3RTsen

DWnt3RTas

**Sequenz 5' – 3'**

CCA GCC GTA CAG CTC AAG

CTG TTG GCT CTT GCG TAC

CTC TGT CCG GCC AAT CAC

GAT CGG TCA GCG GCC CAG TG

ATT CCA CTG CCC GTT TCT G

GCT TCT CTG AAT CTC CCG T

CCA AGA CAT TCT GGA CCA GC

GTT TCG CCT CCT CCA GTT

CAT TCG GGA AAC CTG GTC

CTC CCG TCA GGG AAT CCA T

AAA TTG CGG TCC AAA GAC GG

GTC CTT CTG TCC CTT TGC T

ACG GAC TGC AAG TGC CAT G

CTT CGC TCG CAG TAG TTG G

TTC GTC AAG GCC GAT CTC

CTC CCG ATG TCT TGG CCT T



<i>DWnt4</i>	DWnt4RTsen	ACA AGT GCA AGT GCC ACG
	DWnt4RTas	CAG CGT GGT GTA TTG CGA
<i>DWnt6</i>	DWnt6RTsen	TTT GGC CTT CGT CAC TCG
	DWnt6RTas	GAC TCT CCG GCA TGA AGC T
<i>DWnt10</i>	DWnt10RTsen	ATT CTA ACG CCC GAG GAG
	DWnt10RTas	CTT GCG GAA CTG GTG CTT C
<i>engrailed</i>	engRTsen	CCC AAA CAG CCA AAG GAC
	engRTas	CTC CTC CTC CTC CTT GGT CA
<i>Fak</i>	FAKRTsen	GCT CGG TGT AAA GCC TTT C
	FAKRTas	GCC GCT GGA TTT ATG CCT C
<i>Fak Isoform B</i>	FAKbRTsen	GAC GAA TCT CTC GCT TTC CC
	FAKbRTas	AAC CGA ACA GCC TTG AAG C
<i>fat</i>	fatRTsen	CAA TGG CAC TAT ACG CAC TC
	fatRTas	CTT GAC AGC GAT AAC GAC C
<i>starry night</i>	flamingoRTsen	TGT AAT GAC CAC AGT CCC AC
	flamingoRTas	GAG AAC CTT CAC CTG GAC A
<i>frizzled</i>	fzRTsen	TTG TCT TCT TGG CCG TTT G
	fzRTas	CAA CTT TAG CCA GGG CCA
<i>frizzled2</i>	fz2RTsen	TCG TCC TCC TGC TGA CAT C
	fz2RTas	CAT TCT CTC CGG CCAT TCG
<i>frizzled3</i>	fz3RTsen	AGG GCC TAA CGG ATT GCA G
	fz3RTas	GTC AGA GGT GGG AGA TGC T
<i>frizzled4</i>	fz4RTsen	TCC TGC GCT AGT GTC TTC
	fz4RTas	CAT CGA GCC AAA GAT CCA GT
<i>grunge</i>	grungeRTsen	CTT GAA GCC CAC ATC GCA C
	grungeRTas	CAT CTT GGC TTG CTG TGC
<i>groucho</i>	grouchoRTsen	CTG CAA CAG CAC GAC TTC
	grouchoRTas	GTA GCC TTC TTA TCG CCC G
<i>misshapen</i>	msnRTsen	GCG CTT CCC AAC TCA AAT G
	msnRTas	CAC GAT GAA GCA CCT TTG G
<i>naked cuticle</i>	naked_RT_sen	TGG ACC AGG TGG ACT GTC
	naked_RT_as	GTG ACC CCG ACG CGC TCT T
<i>nemo</i>	nemo_RT_sen	TCA GCT CGC ATG CCA CGC A
	nemo_RT_as	GAA GGC TGC ACT CTG TGG A
<i>Notum</i>	notum_RT_sen	TCC CAG TGG CCA GAG ACG A
	notum_RT_as	GCC ATT GGA AAA CGA AAA GC
<i>pangolin</i>	pangolin_RT_sen	CCG TCA AAA TCA TGC CTC
	pangolin_RT_as	GGC CTT GAA ATT TTG TGA CC
<i>prickle</i>	prickleRTsen	GAC GAC CTA ATC TCC ACG
	prickleRTas	CCT CCC GCA TGA TAT ACC
<i>shaggy</i>	sggRTsen	CGT ATA CAA AGT GGC TCG C
	sggRTas	CTG ATC CAC ACC GGA ATC G
<i>Van Gogh</i>	vangRTsen	CTC GCG GAA TCA CAA CAA C
	vangRTas	GTG ACG GCG GTA GTA TTC T

*wingless*

wgRTsen

ACC CGA TCA GCA AGA TCC

wgRTas

CGA GGT CTC ATT GCA CTG G

## 7.12 Verwendete Antikörper und Marker

Die verwendeten Verdünnungen sowie die Herkunft der primären und sekundären Antikörper sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

### 7.12.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Referenz
anti-Armadillo	1:20	Maus	Hybridoma Bank, Iowa N2 7A1
anti-β3-Tubulin	1:10000	Meerschweinchen	Buttgereit et al., 1996
anti-Cadherin-N	1:100	Ratte	Hybridoma Bank, Iowa DN-Ex #8
anti-Digoxigenin-AP	1:2000/1:5000	Schaf	Roche Diagnostics, Rotkreuz
anti-Duf	1:500	Kaninchen	Kreisköther et al., 2006
anti-Starry night	1:20	Maus	Hybridoma Bank, Iowa Flamingo #74
anti-Frizzled2	1:20	Maus	Hybridoma Bank, Iowa 12A7
anti-Groucho	1:20	Maus	Hybridoma Bank, Iowa anti-gro
anti-MAPK, Activated	1:500	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis M9692
anti-Mef2	1:500	Kaninchen	Bour et al., 1995
anti-Stumps	1:500/1:1000	Kaninchen	Vincent et al., 1998
anti-Tropomyosin [MAC 141]	1:1000	Ratte	Abcam, Cambridge ab50567

### 7.12.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
anti-Kaninchen, DyLight549	1:500	Vector laboratories, Burlingame
anti-Kaninchen, Cy5	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
anti-Maus, DyLight549	1:500	Vector laboratories, Burlingame
anti-Maus, Cy5	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
anti-Meerschweinchen, Cy2	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
anti-Ratte, Alexa Fluor® 488	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove
anti-Ratte, Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove

### 7.12.3 Fluoreszenz-gekoppelte Marker

Marker	Verdünnung	Referenz
Phalloidin–Atto 565	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis

Hoechst 33342

1:125

Thermo Fisher Scientific, Waltham

**7.13 Verwendete Seren**

Fetales Kälberserum

Biochrom AG, Berlin

Ziegenserum

Vector laboratories, Burlingame

**7.14 *Drosophila*-Stämme**

Die verwendeten *Drosophila*-Linien mit dem Kürzel BL wurden über das Bloomington *Drosophila* Stock Center, Bloomington, USA bezogen. Die mit v versehenen Fliegenlinien stammen aus dem Vienna *Drosophila* Resource Center, Wien, Österreich.

**7.14.1 Allgemeine Fliegenlinien**

Fliegenlinie	Beschreibung	Referenz
BL6326	<i>w<sup>1118</sup></i> , Wildtyp	Hoskins et al., 2001

**7.14.2 RNAi-Fliegenlinien**

Fliegenlinie	Beschreibung	Referenz
v51468	UAS- <i>APC-like</i> -RNAi	De Graeve et al., 2012
BL31304	UAS- <i>armadillo</i> -RNAi	
BL31305	UAS- <i>armadillo</i> -RNAi	König und Shcherbata, 2015
BL35004	UAS- <i>armadillo</i> -RNAi	
BL31313	UAS- <i>arrow</i> -RNAi	
BL31473	UAS- <i>arrow</i> -RNAi	
BL53342	UAS- <i>arrow</i> -RNAi	Sen et al., 2011
BL34572	UAS- <i>branchless</i> -RNAi	
BL40871	UAS- <i>breathless</i> -RNAi	
v27106	UAS- <i>breathless</i> -RNAi	
BL31760	UAS- <i>corkscrew</i> -RNAi	González Morales, 2014
v108352	UAS- <i>corkscrew</i> -RNAi	
BL35040	UAS- <i>diego</i> -RNAi	
v108410	UAS- <i>diego</i> -RNAi	
v38077	UAS- <i>DWnt2</i> -RNAi	Luo et al., 2015
v104338	UAS- <i>DWnt2</i> -RNAi	
v38010	UAS- <i>DWnt4</i> -RNAi	
v104671	UAS- <i>DWnt4</i> -RNAi	
v108608	UAS- <i>FAK</i> -RNAi	Lüchtenborg et al., 2014
BL27568	UAS- <i>frizzled2</i> -RNAi	
BL31312	UAS- <i>frizzled2</i> -RNAi	
BL31390	UAS- <i>frizzled2</i> -RNAi	
v44391	UAS- <i>frizzled2</i> -RNAi	Irizarry und Stathopoulos, 2015; Sen et al., 2011
BL35024	UAS- <i>heartless</i> -RNAi	
v6692	UAS- <i>heartless</i> -RNAi	Lewellyn et al., 2013
BL28791	UAS- <i>misshapen</i> -RNAi	
v101517	UAS- <i>misshapen</i> -RNAi	

SILKE FENDER	MATERIAL	
v108679	UAS- <i>pangolin</i> -RNAi	Swaminathan et al., 2012
v101480	UAS- <i>prickle</i> -RNAi	Ng, 2012
v36523	UAS- <i>pyramus</i> -RNAi	Irizarry und Stathopoulos, 2015
v101538	UAS- <i>shaggy</i> -RNAi	Reim et al., 2014
v7376	UAS- <i>Van Gogh</i> -RNAi	González Morales, 2014; Ng, 2012
v21317	UAS- <i>stumps</i> -RNAi	Franzdóttir et al., 2009; Sen et al., 2011
v105603	UAS- <i>stumps</i> -RNAi	
v24536	UAS- <i>thisbe</i> -RNAi	Franzdóttir et al., 2009; Sen et al., 2011
v102441	UAS- <i>thisbe</i> -RNAi	

### 7.14.3 Gal4-Treiberlinien Fliegenlinie

	Beschreibung, Referenz
Mef2-Gal4	Myoblasten-spezifischer Gal4-Treiber, Ranganayakulu et al., 1995
UAS-Dcr-2;;Mef2-Gal4	Myoblasten-spezifischer Gal4-Treiber, Ranganayakulu et al., 1995, verstärkt durch Dicer-2 (BL25756)
UAS-mCD8-GFP;Mef2-Gal4	Myoblasten-spezifischer Gal4-Treiber, Ranganayakulu et al., 1995 in Kombination mit membranständigem GFP in allen Myoblasten (BL32186)
BL6982	C564-Gal4, Gal4-Treiber in der adulten Testishülle, Hrdlicka et al., 2002
BL6986	C805-Gal4, Gal4-Treiber in der adulten Testishülle, Hrdlicka et al., 2002
BL6990	C855a-Gal4, Gal4-Treiber in der adulten Testishülle, Hrdlicka et al., 2002
BL6991	MJ12a-Gal4, Gal4-Treiber in der adulten Testishülle, Pigmentzellen, Hrdlicka et al., 2002
BL6992	MJ33a-Gal4, Gal4-Treiber im Testis, Pigmentzellen, Hrdlicka et al., 2002
BL6997	T100-Gal4, Gal4-Treiber in Testes-Muskeln und Keimzellen, Hrdlicka et al., 2002
BL12796	fz2 <sup>BG01711</sup> , Gal4-Treiber im frizzled2-Muster
BL23827	pyr <sup>MB02808</sup> , Gal4-Treiber im pyramus-Muster
BL24567	Mrtf <sup>MB04134</sup> , Gal4-Treiber im Mrtf-Muster
H94-Gal4	Gal4-Treiber in einem Teil embryonaler Muskeln (zur Verfügung gestellt von Krzysztof Jagla, Clermont University Clermont-Ferrand, Frankreich)
SG24-Gal4	Gal4-Treiber im twist-Muster
tgx-Gal4	Gal4-Treiber im twist-Muster
wg-Gal4	Gal4-Treiber im wingless-Muster

### 7.14.4 Mutanten Fliegenlinie

	Beschreibung, Referenz
BL6651	DWnt4 <sup>C1</sup> , Röntgenstrahl-Mutagenese von DWnt4, Kozopas et al., 1998

BL6907	DWnt2 <sup>L</sup> amorphes Allel, DWnt4 <sup>C1</sup> Röntgenstrahl-Mutagenese von DWnt4, Kozopas et al., 1998
BL6909	DWnt2 <sup>L</sup> amorphes Allel, Kozopas et al., 1998
BL6958	DWnt2 <sup>O</sup> loss of function Allel, amorphes Allel, Kozopas et al., 1998
BL6959	DWnt2 <sup>RJ</sup> temperatursensitives hypomorphes Allel, Kozopas et al., 1998
BL6960	DWnt2 <sup>I</sup> amorphes Allel, temperatursensitives loss of function Allel, Kozopas et al., 1998

#### 7.14.5 UAS-Effektorstämme

##### Fliegenlinie

##### Beschreibung, Referenz

BL6961	UAS-DWnt2.K Transgen für ektopische Expression, Kozopas et al., 1998
BL32186	UAS-mCD8-GFP, membranständiges GFP
BL25756	UAS-Dicer-2

#### 7.14.6 Reporterlinien

##### Fliegenlinie

##### Beschreibung, Referenz

BL8555	armadillo-GFP Reporterkonstrukt
BL8556	armadillo-GFP Reporterkonstrukt
BL41774	dishevelled-eGFP Reporterkonstrukt
BL56298	EndoA <sup>MI1164</sup> , endophilinA GFP gene trap
YD0233	FAK Enhancer GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
CB02997	frizzled2 Enhancer GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
G00357	frizzled3 Enhancer Opposite GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
CC00523	misshapen Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
BL30678	Mrtf <sup>MI00251</sup> , Mrtf GFP Trap
BL52180	Mrtf <sup>MI09592</sup> , Mrtf GFP Trap
BL56442	Mrtf <sup>MI11624</sup> , Mrtf GFP Trap
BL36194	nmo <sup>MI03101</sup> , nemo GFP Trap
BL38664	nemo-GFP.FLAG Reporterkonstrukt
BL58656	nmo <sup>MI13287</sup> , nemo GFP Trap
CB02015	nemo Enhancer GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
BL43799	pico <sup>MI07183</sup> , pico GFP Trap
G00015	shaggy Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
P01776	shaggy Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
ZCL1626	shaggy Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
ZCL1912	shaggy Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
BL38670	Stat92E-GFP.FLAG Reporterkonstrukt
ZCL1700	trol Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
ZCL1973	trol Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
CC00791	viking Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
G00205	viking Protein GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007
G00454	viking GFP Trap, Flytrap: Buszczak et al., 2007



**7.15 Verwendete Software und Internetseiten**

Adobe Bridge CS6	Adobe Systems Incorporated, San José
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems Incorporated, San José
Adobe InDesign CS6	Adobe Systems Incorporated, San José
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Incorporated, San José
ApE® – A plasmid Editor	by M. Wayne Davis
AxioVision LE64	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mendeley Desktop	Mendeley Ltd.
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond
OligoCalc – Oligonucleotide Properties Calculator	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.htm">http://www.basic.northwestern.edu/ biotools/oligocalc.htm</a>

## **8. Methoden**

### **8.1 Histologische Methoden**

#### **8.1.1 Präparation von Genitalscheiben und pupalen Testes**

Männliche weiße Vorpuppen werden gesammelt und in einer Petrischale mit feuchtem Whatman® Paper bis zum gewünschten Alter auf 25°C gehalten. Danach wird die hintere Hälfte der Puppen mit einem Skalpell abgeschnitten und in einen Tropfen PBS transferiert. Genitalscheiben und/oder pupale Testes werden aus den Puppen herauspräpariert und in ein Blockschälchen mit PBT überführt. Die anschließende Fixierung erfolgt für 20 min in 4 % F-PBS. Die Fixierung sowie alle nachfolgenden Waschschrte werden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt.

#### **8.1.2 Präparation adulter Reproduktionssysteme**

Junge männliche Fliegen werden gesammelt und betäubt, die Reproduktionssysteme in einem Tropfen PBS herauspräpariert. Die Fixierung wird für 20 min in 4 % F-PBS durchgeführt. Dieser Schritt sowie alle weiteren Waschschrte erfolgen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

#### **8.1.3 Immunfluoreszenz an Genitalscheiben, pupalen Testes sowie adulten Reproduktionssystemen**

Nach der Fixierung der Genitalscheiben, pupalen Testes oder adulten Reproduktionssysteme werden diese dreimal für jeweils 10 min in PBT gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper folgt ein 30-minütiger Blockschrte in 5 % Ziegen serum in PBT. Der Erstantikörper wird anschließend direkt in diese Blocklösung gegeben, die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag werden die Gewebe wiederum dreimal für jeweils 10 min in PBT gewaschen. Nach diesen Waschschrten folgt die Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (1:500, in PBT). Diese erfolgt im Dunkeln für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Drei weitere 10-minütige Waschschrte in PBT werden im Dunkeln durchgeführt. An Genitalscheiben sowie pupalen Testes wird eine Kernfärbung mit Hoechst (1:125, in PBT) über Nacht bei 4°C gemacht. An adulten Reproduktionssystemen wird eine Kernfärbung mit Hoechst (1:125, in PBT) sowie eine Färbung des Cytoskeletts mit Phalloidin (1:500, in PBT) durchgeführt, ebenfalls bei 4°C über Nacht. Genitalscheiben werden am folgenden Tag in Fluoromount G™ eingebettet und bei 4°C aufbewahrt. Pupale Testes sowie adulte Reproduktionssysteme verbleiben bei 4°C bis zur Auswertung als Frischpräparate.

#### 8.1.4 Cytoskelett- und Kernfärbungen an adulten Reproduktionssystemen

Nach der Fixierung der adulten männlichen Reproduktionssysteme folgen drei 10-minütige Waschschrte in PBT. Anschließend wird das Cytoskelett mit Phalloidin (1:500, in PBT) und die Zellkerne mit Hoechst (1:125, in PBT) markiert. Diese Inkubation erfolgt im Dunkeln und bei 4°C über Nacht. Die Reproduktionssysteme verbleiben bei 4°C bis zur Auswertung als Frischpräparate.

#### 8.1.5 Live imaging von *ex vivo* Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes

Das Protokoll für *ex vivo* Kulturen von Genitalscheiben und pupalen Testes wurde nach Aldaz et al., 2010 modifiziert und etabliert.

Männliche weiße Vorpuppen werden gesammelt und wie zuvor beschrieben bis zum gewünschten Alter gehalten. Die hintere Hälfte der Puppen wird mit einem Skalpell abgeschnitten und in einen Tropfen Genitalscheiben-Kulturmedium transferiert. Die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes werden herauspräpariert und in ein Kulturschälchen ( $\mu$ -Dish<sup>35mm, high</sup> tissue culture treated, ibidi) mit 2 ml Genitalscheiben-Kulturmedium transferiert. Das Kulturmedium setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

2 %	Fetales Kälberserum
0,5 %	Penicillin-Streptomycin
0,1 $\mu$ g/ml	Ecdyson
in Shields and Sang M3 Insect Medium	

Das Genitalscheiben-Kulturmedium wird frisch angesetzt und kann bei 4°C für bis zu 4 Tage aufbewahrt werden. Die Entwicklung der Genitalscheiben und/oder pupalen Testes kann an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop verfolgt werden. Hierzu werden für bis zu 10 Stunden oder über Nacht alle 15 bis 30 min Z-Stapel aufgenommen.

Für größere Experimente mit verschiedenen Ansätzen können die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes alternativ in Well-Platten kultiviert werden. Hierfür werden sie bei 25°C im Dunkeln aufbewahrt und die Entwicklung wird etwa alle 4 Stunden an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop kontrolliert.

#### 8.1.6 *in situ* Hybridisierung an Genitalscheiben und pupalen Testes

Das Protokoll für *in situ* Hybridisierungen an Genitalscheiben und pupalen Testes wurde nach Kozopas et al., 1998 sowie einem bestehenden Protokoll für adulte Testes modifiziert und etabliert.

Männliche weiße Vorpuppen werden wie zuvor beschrieben gesammelt und gehalten. Genitalscheiben und/oder pupale Testes werden präpariert und in einem Blockschälchen mit

PBS auf Eis gesammelt. Die Fixierung erfolgt auf Eis für 15 min in 4 % F-PBS. Anschließend wird die gleiche Menge PBSTD zur Fixierlösung hinzugegeben, die Gewebe werden noch einmal für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgt eine 15-minütige Permeabilisierung in PBSTD sowie zwei Waschschrte für jeweils 10 min in PBT. Es folgt ein Wechsel von PBT zu Hybridisierungslösung (HS-Lösung). Hierzu werden drei Waschschrte in den Verhältnissen 3:1, 1:1 und 1:3 von PBT zu HS-Lösung vollzogen, die jeweils 10 min dauern. Anschließend werden die Gewebe für 10 min in HS-Lösung gewaschen. Für die Prähybridisierung werden pro Probe 500 µl HS-Lösung bei 100°C für 5 min aufgeköcht. Die HS-Lösung wird auf die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes gegeben, die Prähybridisierung erfolgt für 1-4 Stunden bei 58°C. Währenddessen werden die Sonden (1:100, in HS-Lösung) für 5 min auf 80°C erhitzt und danach bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Sonden werden auf die Genitalscheiben gegeben, die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 54-60°C.

Am folgenden Tag werden die Gewebe für 20 min in vorgewärmter HS-Lösung gewaschen. Es folgt der Wechsel von HS-Lösung zurück in PBT. Hierzu werden drei 20-minütige Waschschrte bei 54-60°C in den Verhältnissen 3:1, 1:1 und 1:3 von HS-Lösung zu PBT durchgeführt. Die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes werden viermal für jeweils 5 min in PBT gewaschen, wobei die letzten beiden Waschschrte bei Raumtemperatur verrichtet werden. Die Inkubation mit dem anti-Digoxigenin-AP Antikörper (1:2000, in PBT) erfolgt über Nacht bei 4°C.

Am dritten Tag werden zur Entfernung des Antikörpers vier 20-minütige Waschschrte mit PBT durchgeführt. Es folgen drei 10-minütige Waschschrte in DIGIII unter Zugabe von 0,1 % Tween 20. Anschließend erfolgt die Färbung für ca. 30 min bis 2 Stunden in 1 ml Färbelösung (3,5 µl NBT, 3,5 µl BCIP, 0,1 % Tween 20, ad 1 ml DIGIII) im Dunkeln. Nach der Färbung werden die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes noch einmal in 4 % F-PBT fixiert. Die Fixierlösung wird in mehreren 10-minütigen Waschschrten in PBT ausgewaschen, danach werden die Gewebe entwässert. Die Entwässerung wird in 50 %, 75 % sowie 96 % Ethanol durchgeführt. In jeder Verdünnung wird zweimal gewaschen, wobei der erste Schritt kurz ist und der zweite 10 min dauert. Abschließend wird das 96 % Ethanol noch einmal ausgetauscht und die Genitalscheiben und/oder pupalen Testes werden über Nacht bei 4°C gelagert, bevor sie am folgenden Tag in Epon eingebettet werden.

## 8.2 Molekularbiologische Methoden

### 8.2.1 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Zur Herstellung von Sonden werden zuerst die Vektoren linearisiert, in denen das zu untersuchende Gen bzw. dessen cDNA enthalten ist. Für das Transkript dieses Gens sollen Sonden hergestellt werden, um die Transkription *in situ* nachvollziehen zu können. Hierzu werden 1-5 µg der Plasmid-DNA mit 0,3 µl eines FastDigest® Restriktionsenzym für ca. 60 min restringiert.

Die linearisierte Vektor-DNA wird anschließend durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert. Hierfür werden zur DNA-Lösung 1/10 VT Natriumacetatlösung (3 M) und 2,5 VT eiskalter 96 % Ethanol gegeben. Die DNA wird für 15 min bei -20°C gefällt. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C. Nach Verwerfen des Überstandes wird das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen (20 min, 4°C, 13.000 Upm), das resultierende Pellet wird an der Luft getrocknet und in 10 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Anschließend erfolgt die *in vitro* Transkription der RNA-Sonden. Hierzu wird das DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Rotkreuz) verwendet.

Reaktionsansatz:	1-5 µg	linearisierte Vektor-DNA
	2 µl	Transkriptionspuffer (10x)
	2 µl	DIG RNA Labeling Mix (10x)
	1 µl	RNA Polymerase
	ad 20 µl	RNase freies H <sub>2</sub> O

Die *in vitro* Transkription erfolgt für 2-3 Stunden bei 37°C. Die RNA-Sonden werden anschließend durch eine erneute Ethanol-Fällung präzipitiert und in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Sonden werden bei -20°C gelagert.

### 8.2.2 Spot-Test DIG-markierter RNA-Sonden

Zur Kontrolle der DIG-markierten RNA-Sonden wird ein Spot-Test durchgeführt. Hierzu wird je 1 µl von drei Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000 in ddH<sub>2</sub>O) auf eine Nylonmembran gegeben und durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent vernetzt. Die Membran wird eine Minute in DIGI gewaschen und für 30 min in PBT geblockt. Anschließend wird die Membran für 30 min mit anti-Digoxigenin-AP (1:5000 in PBT) inkubiert. Nach zwei 5-minütigen Waschschritten in DIGI folgt ein 2-minütiger in DIGIII. Die anschließende Färbung erfolgt im Dunkeln mit 2 ml Färbelösung (4,5 µl NBT, 3,5 µl BCIP ad 1 ml DIGIII). Wird nach etwa 5 Minuten eine Färbung bei der 1:1000-Verdünnung sichtbar, ist die Sonde ausreichend markiert. Die Färbung wird durch Waschen gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.



### 8.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Hierzu benötigt man synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte Primer, die zu den 5'- sowie 3'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes komplementär sind. Eine hitzestabile *Taq*-Polymerase kann den DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern synthetisieren, wodurch es in 30 Zyklen zu einer exponentiellen Vervielfachung des DNA-Fragmentes kommt. Die Bedingungen der PCR variieren in Abhängigkeit der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes sowie der Schmelztemperatur (melting temperature,  $T_m$ ) der Primer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Durchführung der PCR die AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham) sowie die *Taq* DNA Polymerase (Axon, Kaiserslautern) verwendet.

#### Protokoll bei Verwendung der AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase

Reaktionsansatz:	1 µl	genomische DNA (1:10)
	5 µl	AccuPrime™ PCR Puffer II (10x)
	0,5 µl	sense-Primer (20 pmol/µl)
	0,5 µl	antisense-Primer (20 pmol/µl)
	0,4 µl	AccuPrime™ <i>Taq</i> DNA Polymerase (2 U/µl)
	ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

#### PCR Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung	95°C	5 min
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Annealing	$T_m$	1 min
4. Elongation	68°C	1 min pro 1 kb, Anzahl PCR-Zyklen: 30
5. Elongation	68°C	10 min
6. Pause	4°C	∞

#### Protokoll bei Verwendung der *Taq* DNA Polymerase (Axon)

Reaktionsansatz:	1 µl	genomische DNA (1:10)
	5 µl	Puffer BD (10x)
	5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	5 µl	dNTP (2 mM pro NTP)
	1 µl	sense-Primer (25 pmol/µl)
	1 µl	antisense-Primer (25 pmol/µl)
	0,5 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
	ad 50 µl	ddH <sub>2</sub> O

#### PCR Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Annealing	$T_m$	1 min
4. Elongation	72°C	1 min pro 1 kb, Anzahl PCR-Zyklen: 30
5. Elongation	72°C	10 min
6. Pause	4°C	∞

### 8.2.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können mittels Gelelektrophorese bezüglich ihrer Größe voneinander getrennt werden. Um Agarosegele für diesen Zweck zu gießen, wird 1 % Agarose in 1x TBE aufgekocht und auf ca. 60°C abkühlen gelassen. Pro 100 ml Agarosegel wird 1 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Agarosegel wird gegossen, ein Kamm wird eingesteckt und nach Aushärtung des Gels herausgezogen. Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Es werden 2 µl Größenstandard sowie die mit Ladepuffer versetzten aufzutrennenden Proben in die Taschen geladen. Je nach Größe des Gels werden Spannungen von 60 – 100 V angelegt. Die DNA-Fragmente werden aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates in Richtung der Anode laufen und durch Interkalation des Ethidiumbromids durch UV-Licht sichtbar gemacht.

### 8.2.5 Ligation von PCR-Produkten mithilfe des TOPO® Cloning Kits

Zur Ligation von PCR-Produkten in den *pCRII-TOPO*® Vektor wird das TOPO® Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet.

Reaktionsansatz:	2 µl	PCR-Produkt
	ad 5 µl	ddH <sub>2</sub> O
	0,5 µl	<i>pCRII-TOPO</i> ® Vektor

Die Komponenten werden gemischt und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 8.2.6 Transformation chemisch kompetenter DH5α Zellen

#### 8.2.6.1 Transformation eines Ligationsansatzes

Zur Transformation chemisch kompetenter DH5α *Escherichia coli* Zellen werden 2 µl des Ligationsansatzes auf die Zellen gegeben. Diese werden für 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C durchgeführt wird. Die Zellen werden für 2 min zurück auf Eis gestellt und 250 µl vorgewärmtes LB-Medium wird hinzugefügt. Es folgt eine etwa 45-minütige Inkubation der Zellen bei 37°C auf dem Schüttler. Anschließend werden die Zellen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht verkehrt herum bei 37°C inkubiert.

#### 8.2.6.2 Transformation von cDNAs

Zur Transformation gekaufter cDNAs auf Whatman® Plättchen wird das Plättchen zunächst halbiert, wobei nur eine Hälfte weiterbearbeitet wird. Zum Abwaschen der Chemikalien vom Whatman® Plättchen werden 50 µl steriles TE (1x) hinzugegeben und für 1-2 sec auf- und abpipettiert. Das TE wird abgezogen und das Plättchen auf Eis gelagert, bis 50 µl

chemisch kompetente DH5 $\alpha$  Zellen hinzugefügt werden. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, bevor der Hitzeschock für 2 min bei 37°C durchgeführt wird. Die Zellen werden ohne das Plättchen in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben, für 60 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Das Wachstum der Zellen erfolgt bei 37°C über Nacht.

### **8.2.7 Plasmidaufreinigung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)**

Für eine Mini-Präparation wird zunächst eine Kolonie der Agarplatte in 3 ml LB-Medium mit 2  $\mu$ l Chloramphenicol (34 mg/ml) bzw. 3  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag werden 1,5 ml dieses Ansatzes bei 13.000 Upm für 30 sec abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zell-Pellet in 100  $\mu$ l Puffer E1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Puffer E2 und Mischen durch Invertieren erfolgt eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, in der die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen werden. Durch Hinzufügen von 150  $\mu$ l Puffer E3 sowie Invertieren wird der Ansatz neutralisiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm wird der klare Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit 320  $\mu$ l Isopropanol wird die Plasmid-DNA bei einer 30-minütigen Zentrifugation mit 13.000 Upm bei 10°C gefällt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 320  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen (13.000 Upm, 10 min, 10°C). Das resultierende Pellet wird für 3-5 min an der Luft getrocknet und in 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

### **8.2.8 Plasmidaufreinigung in präparativem Maßstab (Midi-Präparation)**

Um eine größere Menge Plasmid-DNA gewinnen zu können, wird eine Midi-Präparation durchgeführt. Hierzu werden zunächst 30  $\mu$ l einer Übernacht-Kultur sowie 30  $\mu$ l des entsprechenden Antibiotikums (Chloramphenicol 34 mg/ml, Ampicillin 100 mg/ml) in 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird die angewachsene Kultur für 10 min bei 4.000 Upm und 10°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zell-Pellet in 4 ml Puffer E1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer E2, Invertieren sowie eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen aufgeschlossen. In der Zwischenzeit wird eine Säule mit 10 ml Puffer E4 equilibriert. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 4 ml Puffer E3 und Invertieren des Ansatzes. Anschließend wird eine Zentrifugation für 10 min bei 6.000 Upm durchgeführt. Der klare Überstand wird auf die equilibrierte Säule gegeben. Nachdem die Säule leergelaufen ist folgen zwei Waschschrte mit jeweils 10 ml Puffer E5. Zur Elution der gebundenen DNA werden 5 ml Puffer E6 auf die Säule gegeben, das Eluat wird in einem

15 ml Falcon aufgefangen. Zur Fällung der Plasmid-DNA werden 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben, invertiert und nach Aufteilung auf vier 2 ml Reaktionsgefäße werden diese für 30 min bei 13.000 Upm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (13.000 Upm, 10 min, 10°C). Nachdem die resultierenden Pellets für 3-5 min an der Luft getrocknet wurden, wird jedes in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, gelöst und zusammengeführt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

### 8.2.9 Plasmid-Restriktion mithilfe von Endonukleasen

Die Analyse der Plasmid-DNA bezüglich der Insertion von DNA-Fragmenten erfolgt mithilfe von Restriktionsenzymen. Für eine Restriktion werden FastDigest® Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Ipswich) verwendet.

Reaktionsansatz:	bis zu 3 µg Plasmid-DNA
	0,25-0,3 µl FastDigest® Restriktionsenzym (jeweils)
	2 µl CutSmart® Puffer (10x)
	ad 20 µl ddH <sub>2</sub> O

Die Restriktion erfolgt für 30 min bei 37°C. Zur Analyse der Proben werden jeweils 10 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 8.2.10 Isolierung mCD8-GFP-positiver Myoblasten aus Genitalscheiben

Männliche weiße Vorpuppen der Fliegenlinie MefGal4>>UAS-mCD8-GFP werden gesammelt und bis zum gewünschten Alter gehalten. Für die Isolierung der Myoblasten werden Genitalscheiben möglichst steril in Schneider's *Drosophila* Medium präpariert und auf Eis in einem Reaktionsgefäß gelagert. Die Genitalscheiben werden dreimal kurz mit jeweils 150 µl Cell Dissociation Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis) gewaschen, bevor die Dissoziation der Genitalscheiben beginnt. Hierzu werden 10 µl Elastase (5 mg/ml, in Cell Dissociation Solution) auf die Genitalscheiben gegeben, der Ansatz wird leicht geschüttelt und die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Währenddessen werden die magnetischen Beads vorbereitet, die zur Isolation der mCD8-positiven Myoblasten verwendet werden. Hierzu werden 10 µl Dynabeads® Mouse CD8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham) in 1 ml Cell Dissociation Solution resuspendiert, der Ansatz wird für 1 min in ein magnetisches Gestell gehalten, um die Lösung ohne die Dynabeads® abzusaugen. Die nun gewaschenen Dynabeads® werden in 10 µl Cell Dissociation Solution aufgenommen. Auf die dissoziierten Genitalscheiben werden ebenfalls 170 µl Cell Dissociation Solution gegeben, bevor die Dynabeads® hinzugefügt werden. Die folgende Inkubation findet auf Eis für 20 min statt, hierbei sollte sich der Ansatz leicht bewegen. Zur Aufreinigung der an die Dynabeads®

gebundenen Myoblasten folgen drei Waschschr tte. In jedem Waschschr tt wird der Ansatz für 2 min in das magnetische Gestell gehalten, der Überstand wird abgenommen und die an die Dynabeads<sup> </sup> gebundenen Myoblasten werden in 1 ml Cell Dissociation Solution resuspendiert. Hierbei ist zu beachten, dass der Ansatz k hl zu halten ist. Aus den aufgereinigten Myoblasten kann direkt im Anschluss RNA isoliert werden.

#### **8.2.11 Gesamt-RNA Isolation aus Myoblasten**

Zur RNA Isolation aus aufgereinigten, an Dynabeads<sup> </sup> gebundenen Myoblasten wird das RNeasy<sup> </sup>-Micro total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet. Hierfür wird zuerst ein Aliquot Elution Solution auf 75 C erhitzt und der Waschpuffer 2/3 auf Raumtemperatur aufgewärmt. Zur Isolation der RNA werden zunächst 100 Öl Lysis-Puffer auf die an Dynabeads<sup> </sup> gebundenen Myoblasten gegeben und der Ansatz wird gevortext. Anschließend werden 50 Öl 100 % Ethanol hinzugefügt und das Lysat wird auf eine Säule gegeben. Diese wird für ca. 10 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert, bis die Flüssigkeit durch den Filter gelaufen ist. Es folgt ein Waschschr tt mit 180 Öl Waschpuffer 1, welcher ebenfalls durch eine kurze Zentrifugation durch den Filter läuft. Zwei weitere Waschschr tte mit jeweils 180 Öl Waschpuffer 2/3 folgen, die analog durchzuführen sind. Zur Entfernung eventueller Reste der Waschpuffer wird das Sammelgefäß geleert und die Säule wird 1 min bei 13.000 Upm leer zentrifugiert. Zur anschließenden Elution der RNA wird die Säule in ein neues Sammelgefäß gegeben und 10 Öl der erhitzten Elution Solution werden auf die Säule gegeben. Es folgt eine einmin tliche Inkubation bei Raumtemperatur, bevor die Säule mit dem Eluat für 30 sec bei 13.000 Upm zentrifugiert wird. Um die Effizienz der Elution zu verbessern, wird dieser Schritt wiederholt. Die isolierte Gesamt-RNA wird anschließend bei -20 C gelagert.

#### **8.2.12 Gesamt-RNA Isolation aus pupalen Testes**

Männliche weiße Vorpuppen werden gesammelt und bis zum gewünschten Alter gehalten. Für die RNA-Isolation werden pupale Testes möglichst steril in Schneider's *Drosophila* Medium präpariert und auf Eis in einem Reaktionsgefäß gelagert. Die Testes werden dreimal kurz mit jeweils 150 Öl Cell Dissociation Solution (Sigma-Aldrich, St. Louis) gewaschen, bevor die Dissoziation beginnt. Hierzu werden 10 Öl Elastase (5 mg/ml, in Cell Dissociation Solution) auf die pupalen Testes gegeben, der Ansatz wird leicht geschüttelt und die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss können die dissoziierten pupalen Testes bis zu 15 min auf Eis gelagert werden, bevor mit der Isolation der Gesamt-RNA begonnen wird. Dies geschieht analog zur Gesamt-RNA Isolation aus Myoblasten mit dem



RNAqueous<sup>®</sup>-Micro total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham).

### 8.2.13 mRNA Isolation aus Myoblasten-Gesamt-RNA

Zur Isolation von mRNA aus Gesamt-RNA wird das Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Venlo) verwendet. Zur Vorbereitung wird die Oligotex Suspension auf 37°C erwärmt, durch Vortexen gemischt und auf Raumtemperatur gelagert. Zusätzlich wird der Puffer OEB auf 70°C erhitzt und, falls nötig, der Puffer OBB auf 37°C erwärmt, um das Präzipitat aufzulösen. Zu Beginn der mRNA Isolation wird das Gesamtvolumen der RNA mit RNase-freiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Anschließend werden 250 µl Puffer OBB sowie 15 µl Oligotex Suspension dazugegeben, der Ansatz wird gemischt und für 3 min bei 70°C inkubiert. Es folgt eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor der Oligotex:mRNA Komplex durch Zentrifugation (2 min, 13.000 Upm) pelletiert wird. Der resultierende Überstand wird abgenommen und aufgehoben. Das Oligotex:mRNA Pellet wird in 400 µl Puffer OW2 resuspendiert, auf eine kleine Säule (spin column) gegeben und 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Zum Waschen wird die Säule anschließend in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gegeben und 400 µl Puffer OW2 werden auf die Säule pipettiert, die Säule wird 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elution der mRNA wird die Säule wiederum in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gegeben, 20 µl erhitzter Puffer OEB werden auf die Säule pipettiert und das Pellet bei 70°C durch Pipettieren resuspendiert. Ein abschließender Zentrifugationsschritt (1 min, 13.000 Upm) sammelt die gelöste mRNA im Puffer OEB im Sammelgefäß. Zur größtmöglichen Ausbeute an mRNA in wenig Volumen wird der Elutionsschritt mit dem durchgelaufenen Puffer OEB wiederholt, wobei die Resuspendierung wiederum bei 70°C erfolgt. Die resultierende mRNA wird bei -20°C gelagert.

### 8.2.14 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) wird zur Amplifikation von RNA-Fragmenten verwendet. Hierbei wandelt in einem ersten Schritt das Enzym Reverse Transkriptase RNA-Fragmente in cDNA um, welche dann im zweiten Schritt mithilfe spezifischer Primer im Zuge einer PCR exponentiell vervielfältigt wird. Die Bedingungen der PCR variieren in Abhängigkeit der Größe des Fragmentes sowie der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer.

Zur Durchführung der RT-PCR wird das OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Venlo) verwendet.

Reaktionsansatz:	1 µl	Gesamt-RNA (1:10) oder mRNA (1:10)
	4 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Puffer (5x)
	4 µl	Q-Solution
	1 µl	dNTP-Mix (10 mM)
	3 µl	sense-Primer (30 pmol/µl)
	3 µl	antisense-Primer (30 pmol/µl)
	0,8 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Enzym-Mix
	ad 20 µl	RNase-freies Wasser

## RT-PCR Bedingungen:

1. Reverse Transkription	50°C	30 min
2. PCR-Aktivierung	95°C	15 min
3. Denaturierung	95°C	1 min
4. Annealing	T <sub>m</sub>	1 min
5. Elongation	72°C	variabel, Anzahl PCR-Zyklen: 35
6. Elongation	72°C	10 Minuten
7. Pause	4°C	∞

### 8.3 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

#### 8.3.1 Stammhaltung und Zucht

Die Haltung und Zucht von *D. melanogaster* erfolgt auf Maismehlagar in kleinen oder mittelgroßen Fliegenflaschen. Die Fliegen werden auf 18°C oder 25°C gehalten und in regelmäßigen Abständen umgesetzt. Bei 25°C beträgt die Generationszeit etwa 10 Tage.

#### 8.3.2 Ansetzen von Kreuzungen

Für Kreuzungen werden die Fliegen mit CO<sub>2</sub> betäubt und dem Geschlecht entsprechend sortiert. Es werden jungfräuliche Weibchen mit Männchen gekreuzt. Um jungfräuliche Weibchen zu erhalten, werden Flaschen mit schlüpfenden Fliegen von den adulten Tieren befreit. Da frisch geschlüpfte Männchen erst nach 6 Stunden reife Spermien aufweisen, können alle in diesem Zeitraum geschlüpften Weibchen als Jungfrauen verwendet werden.

#### 8.3.3 Kreuzungsgenetik von RNAi-Kreuzungen

Zur RNAi-vermittelten Herunterregulation der Transkriptmenge spezifischer Gene wird das aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammende UAS-Gal4 System verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Hierzu werden zwei verschiedene Fliegenlinien benötigt. Die sogenannte Treiberlinie exprimiert gewebespezifisch das Gal4-Protein. Die Effektorlinie trägt ein RNAi-Konstrukt des zu untersuchenden Gens hinter einer UAS-Sequenz. Bringt man beide Linien bei einer Kreuzung zusammen, wird das Gal4-Protein gewebespezifisch exprimiert und kann an die UAS-Sequenz binden, wodurch das RNAi-Konstrukt exprimiert wird. Auf diese Weise kann man den Treiberlinien entsprechend in verschiedenen Geweben

RNAi-vermittelt Gene herunterregulieren. Für RNAi-Kreuzungen werden mindestens zwei mit Trockenhefe versetzte mittlere Flaschen mit jeweils 10 Jungfrauen der Treiberlinie und 10 Männchen der Effektorlinie versehen. Diese Elterntiere können im wöchentlichen Abstand auf neue mittlere, beheizte Flaschen gesetzt werden. Die Tiere der  $F_1$ -Generation werden ausgewertet.

#### 8.3.4 Kernzählungen bei RNAi-Kreuzungen

Männliche weiße Vorpuppen der  $F_1$ -Generation von RNAi-Kreuzungen sowie der Effektorlinien werden gesammelt und für 42 Stunden bei 25°C gehalten. Pupale Testes werden präpariert und wie zuvor beschrieben fixiert. Es folgt eine Immunfluoreszenz-Markierung (siehe 7.1.3) mit einem anti-Tropomyosin Antikörper inklusive Kernfärbung. Die markierten pupalen Testes werden als Frischpräparate an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Kernzahl pro Muskel der  $F_1$ -Generation der RNAi-Kreuzungen sowie der Effektorlinien wird gezählt ( $n = 200$ ). Anschließend wird der Fusionsindex ( $F_i$ ) mithilfe der folgenden Formel berechnet.

$$F_i = \frac{\text{durchschnittliche Kernzahl pro Muskel } F_1\text{-Generation}}{\text{durchschnittliche Kernzahl pro Muskel Effektorlinie}}$$

#### 8.3.5 Fertilitätstests von RNAi-Kreuzungen

Für Fertilitätstests werden Wildtyp-Jungfrauen gesammelt. Jede RNAi-Kreuzung muss dreimal unabhängig voneinander auf Fertilität getestet werden. Für jeden Test werden 10 kleine mit Trockenhefe versetzte Fliegenflaschen mit jeweils drei Wildtyp-Jungfrauen sowie einem Männchen der  $F_1$ -Generation der RNAi-Kreuzung bestückt. Die Fliegen verpaaren sich, bevor sie nach 7 Tagen von den Flaschen entfernt werden. Die Auswertung erfolgt wiederum 7 Tage später. Hierbei wird pro Test der Anteil an Flaschen bestimmt, in denen Nachkommen vorhanden sind. Zur Kontrolle werden jeweils drei Fertilitätstests mit Männchen der Effektorlinie durchgeführt.

**9. Literaturverzeichnis**

- Ahmad, S. M. and Baker, B. S.** (2002). Sex-specific deployment of FGF signaling in *Drosophila* recruits mesodermal cells into the male genital imaginal disc. *Cell* **109**, 651–61.
- Ahumada, A., Slusarski, D. C., Liu, X., Moon, R. T., Malbon, C. C. and Wang, H.** (2002). Signaling of Rat Frizzled-2 Through Phosphodiesterase and Cyclic GMP. *Science* **271**, 8–13.
- Akiyoshi, R., Kaneuch, T., Aigaki, T. and Suzuki, H.** (2014). Bioluminescence imaging to track real-time armadillo promoter activity in live *Drosophila* embryos. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 5703–13.
- Akong, K., Grevengoed, E. E., Price, M. H., McCartney, B. M., Hayden, M. A., DeNofrio, J. C. and Peifer, M.** (2002). *Drosophila* APC2 and APC1 play overlapping roles in wingless signaling in the embryo and imaginal discs. *Dev. Biol.* **250**, 91–100.
- Aldaz, S., Escudero, L. M. and Freeman, M.** (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14217–22.
- Aman, A. and Piotrowski, T.** (2008). Wnt/beta-Catenin and Fgf Signaling Control Collective Cell Migration by Restricting Chemokine Receptor Expression. *Dev. Cell* **15**, 749–761.
- Aman, A. and Piotrowski, T.** (2009). Multiple signaling interactions coordinate collective cell migration of the posterior lateral line primordium. *Cell Adhes. Migr.* **3**, 365–368.
- Bainbridge, S. P. and Bownes, M.** (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **66**, 57–80.
- Baker, N. E.** (1987). Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *EMBO J.* **6**, 1765–73.
- Bastock, R. and Strutt, D.** (2007). The planar polarity pathway promotes coordinated cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Development* **134**, 3055–64.
- Baylies, M. K., Martinez Arias, A. and Bate, M.** (1995). wingless is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **121**, 3829–3837.

- Benndorf, R., Hayeß, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. and Lutsch, G.** (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 20780–20784.
- Bodenstein, D.** (1950). The postembryonic development of *Drosophila*. In *Biology of Drosophila* (ed. Demerec, M.), pp. 275–367. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q. and Raz, E.** (2008). Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell* **132**, 463–473.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M. and Nguyen, H. T.** (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730–741.
- Boyle, M. and DiNardo, S.** (1995). Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development* **121**, 1815–1825.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15.
- Brewer, R. J., Mazot, P. and Soriano, P.** (2016). Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling. *Genes Dev.* **30**, 751–771.
- Bulgakova, N. A., Klapholz, B. and Brown, N. H.** (2012). Cell adhesion in *Drosophila*: versatility of cadherin and integrin complexes during development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 702–712.
- Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J., Owen, S., Skora, A. D., Nystul, T. G., Ohlstein, B., Allen, A., et al.** (2007). The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* **175**, 1505–31.
- Buttgereit, D., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1996). Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by expression of beta 3 and beta 1 tubulin isoforms, respectively. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 189–96.
- Cabrera, C. V., Alonso, M. C., Johnston, P., Phillips, R. G. and Lawrence, P. A.** (1987). Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* **50**, 659–663.



- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G. A., Parsons, M., Stern, C. D. and Mayor, R.** (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* **456**, 957–61.
- Chen, E. H. and Baker, B. S.** (1997). Compartmental organization of the *Drosophila* genital imaginal discs. *Development* **124**, 205–18.
- Chen, R. E. and Thorner, J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1773**, 1311–1340.
- Chittaranjan, S., Xu, J., Kuzyk, M., Dullat, H. K., Wilton, J., DeVorkin, L., Lebovitz, C., Morin, G. B., Marra, M. A. and Gorski, S. M.** (2015). The *Drosophila* TIPE family member Sigmar interacts with the Ste20-like kinase Misshapen and modulates JNK signaling, cytoskeletal remodeling and autophagy. *Biol. Open* **4**, 672–84.
- Cobrerros-Reguera, L., Fernández-Miñán, A., Fernández-Espartero, C. H., López-Schier, H., González-Reyes, A. and Martín-Bermudo, M. D.** (2010). The Ste20 kinase misshapen is essential for the invasive behaviour of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *EMBO Rep.* **11**, 943–9.
- Cohen, E. D., Mariol, M., Wallace, R. M. H., Weyers, J., Kamberov, Y. G., Pradel, J., Wilder, E. L., Scientifique, P., Case, D. L. and Cedex, M.** (2002). DWnt4 Regulates Cell Movement and Focal Adhesion Kinase during *Drosophila* Ovarian Morphogenesis. *Dev. Cell* **2**, 437–448.
- De Graeve, F. M., Van de Bor, V., Ghiglione, C., Cerezo, D., Jouandin, P., Ueda, R., Shashidhara, L. S. and Noselli, S.** (2012). *Drosophila* apc regulates delamination of invasive epithelial clusters. *Dev. Biol.* **368**, 76–85.
- DeFalco, T. J., Verney, G., Jenkins, A. B., Mccaffery, J. M., Russell, S. and Doren, M. Van** (2003). Sex-Specific Apoptosis Regulates Sexual Dimorphism in the *Drosophila* Embryonic Gonad. *Dev. Cell* **5**, 205–216.
- DeFalco, T., Camara, N., Le Bras, S. and Van Doren, M.** (2008). Nonautonomous Sex Determination Controls Sexually Dimorphic Development of the *Drosophila* Gonad. *Dev. Cell* **14**, 275–286.

- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151–6.
- Estrada, B., Casares, F. and Sánchez-Herrero, E.** (2003). Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Differentiation* **71**, 299–310.
- Fanto, M., Clayton, L., Meredith, J., Hardiman, K., Charroux, B., Kerridge, S. and McNeill, H.** (2003). The tumor-suppressor and cell adhesion molecule Fat controls planar polarity via physical interactions with Atrophin, a transcriptional co-repressor. *Development* **130**, 763–774.
- Foe, V. E., Odell, G. M. and Edgar, B. A.** (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. Bate, M.) and Martinez Arias, A.), pp. 149–300. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Franzdóttir, S. R., Engelen, D., Yuva-Aydemir, Y., Schmidt, I., Aho, A. and Klämbt, C.** (2009). Switch in FGF signalling initiates glial differentiation in the *Drosophila* eye. *Nature* **460**, 758–61.
- Fuller, M. T.** (1993). Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, pp. 71–147. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B.-Z.** (1997). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **124**, 3535–3541.
- Gärtner, S. M. K., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R. and Awe, S.** (2014). Ex vivo Culture of *Drosophila* Pupal Testis and Single Male Germ-line Cysts: Dissection, Imaging, and Pharmacological Treatment. *J. Vis. Exp.* 1–13.
- Gerlitz, O. and Basler, K.** (2002). Wingful, an extracellular feedback inhibitor of Wingless. *Genes Dev.* **16**, 1055–1059.
- Giráldez, A. J., Copley, R. R. and Cohen, S. M.** (2002). HSPG modification by the secreted enzyme Notum shapes the Wingless morphogen gradient. *Dev. Cell* **2**, 667–76.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q. and Michelson, A. M.** (1996). heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **10**, 3003–3017.

- Glazer, L. and Shilo, B. Z.** (1991). The Drosophila FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell extension. *Genes Dev.* **5**, 697–705.
- Glise, B., Bourbon, H. and Noselli, S.** (1995). hemipterous Encodes a Novel Drosophila MAP Kinase Kinase, Required for Epithelial Cell Sheet Movement. *Cell* **83**, 451–461.
- González Morales, N.** (2014). The adult hindgut as a model to study left-right morphogenesis in Drosophila : coupling of myosin ID and planar cell polarity for left / right morphogenesis in Drosophila.
- Greig, S. and Akam, M.** (1995). The role of homeotic genes in the specification of the Drosophila gonad. *Curr. Biol.* **5**, 1057–1062.
- Gryzik, T. and Müller, H.-A. J.** (2004). FGF8-like1 and FGF8-like2 Encode Putative Ligands of the FGF Receptor Htl and Are Required for Mesoderm Migration in the Drosophila Gastrula. *Curr. Biol.* **14**, 659–667.
- Hall, E. T. and Verheyen, E. M.** (2015). Ras-activated Dsor1 promotes Wnt signaling in Drosophila development. *J. Cell Sci.* **128**, 4499–4511.
- Han, Z., Li, X., Wu, J. and Olson, E. N.** (2004). A myocardin-related transcription factor regulates activity of serum response factor in Drosophila. **101**, 12567–12572.
- Hannon, K., Kudla, A. J., McAvoy, M. J., Clase, K. L. and Olwin, B. B.** (1996). Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms. *J Cell Biol* **132**, 1151–1159.
- Hartenstein, V.** (1993). Atlas of Drosophila development. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. Bate, M. and Martinez Arias, A.), p. 1993. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hedges, J. C., Dechert, M. a, Yamboliev, I. a, Martin, J. L., Hickey, E., Weber, L. a and Gerthoffer, W. T.** (1999). A Role for p38 MAPK / HSP27 Pathway in Smooth Muscle Cell Migration. *Biochemistry* **274**, 24211–24219.
- Heisenberg, C. P.** (2009). Dorsal closure in Drosophila: Cells cannot get out of the tight spot. *BioEssays* **31**, 1284–1287.
- Holstein, T. W.** (2012). The evolution of the Wnt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a007922.

- Hooper, J. E.** (1994). Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in *Drosophila* embryos. *Nature* **372**, 461–4.
- Hoskins, R., Phan, A., Naeemuddin, M., Mapa, F., Ruddy, D., Ryan, J., Young, L., Wells, T., Kopczynski, C. and Ellis, M.** (2001). Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic Mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**, 1100–1113.
- Houalla, T., Hien Vuong, D., Ruan, W., Suter, B. and Rao, Y.** (2005). The Ste20-like kinase misshapen functions together with Bicaudal-D and dynein in driving nuclear migration in the developing *drosophila* eye. *Mech. Dev.* **122**, 97–108.
- Hrdlicka, L., Gibson, M., Kiger, A., Micchelli, C. and Schober, M.** (2002a). Analysis of Twenty-Four Gal4 Lines in *Drosophila melanogaster*. **57**, 51–57.
- Hrdlicka, L., Gibson, M., Kiger, A., Micchelli, C., Schober, M., Schöck, F. and Perimon, N.** (2002b). Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **34**, 51–57.
- Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D.** (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619–4628.
- Hudson, A. M., Petrella, L. N., Tanaka, A. J. and Cooley, L.** (2008). Mononuclear muscle cells in *Drosophila* ovaries revealed by GFP protein traps. *Dev. Biol.* **314**, 329–40.
- Hui Yong Loh, S. and Russell, S.** (2000). A *Drosophila* group E Sox gene is dynamically expressed in the embryonic alimentary canal. *Mech. Dev.* **93**, 185–188.
- Hunger-Glaser, I., Salazar, E. P., Sinnett-Smith, J. and Rozengurt, E.** (2003). Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: Requirement for ERK activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 22631–22643.
- Imam, F., Sutherland, D., Huang, W. and Krasnow, M. a** (1999). stumps, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations of tracheal and mesodermal cells. *Genetics* **152**, 307–318.
- Irizarry, J. and Stathopoulos, A.** (2015). FGF signaling supports *Drosophila* fertility by regulating development of ovarian muscle tissues. *Dev. Biol.* **404**, 1–13.
- Jaglarz, M. K. and Howard, K. R.** (1995). The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* **121**, 3495–3503.

- Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. and Mlodzik, M.** (2005). Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 691–697.
- Johnson, G. and Lapadat, R.** (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* (80-. ). **298**, 1911–1912.
- Kadam, S., Ghosh, S. and Stathopoulos, A.** (2012). Synchronous and symmetric migration of *Drosophila* caudal visceral mesoderm cells requires dual input by two FGF ligands. *Development* **139**, 699–708.
- Karess, R. E., Chang, X., Edwards, K. A., Kulkarni, S., Aguilera, I. and Kiehartt, D. P.** (1991). The Regulatory Light Chain of Nonmuscle Myosin Is Encoded by spaghetti-squash , a Gene Required for Cytokinesis in *Drosophila*. *Cell* **65**, 1177–1189.
- Kehn-Hall, K., Guendel, I., Carpio, L., Skaltsounis, L., Meijer, L., Al-Harthi, L., Steiner, J. P., Nath, A., Kutsch, O. and Kashanchi, F.** (2011). Inhibition of Tat-mediated HIV-1 replication and neurotoxicity by novel GSK3-beta inhibitors. *Virology* **415**, 56–68.
- Kim, W., Kim, M. and Jho, E.** (2013). Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem. J.* **450**, 9–21.
- Klämbt, C., Glazer, L. and Shilo, B.-Z.** (1992). breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog , is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev.* **6**, 1668–1678.
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P. and Cheresch, D. A.** (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **137**, 481–492.
- Komiya, Y. and Habas, R.** (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75.
- König, A. and Shcherbata, H. R.** (2015). Soma influences GSC progeny differentiation via the cell adhesion-mediated steroid-let-7-Wingless signaling cascade that regulates chromatin dynamics. *Biol. Open* **4**, 285–300.
- Köppen, M., Fernández, B. G., Carvalho, L., Jacinto, A. and Heisenberg, C.-P.** (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development* **133**, 2671–2681.



- Kotlyarov, A., Yannoni, Y., Fritz, S., Laass, K., Telliez, J.-B., Pitman, D., Lin, L.-L. and Gaestel, M.** (2002). Distinct cellular functions of MK2. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4827–4835.
- Kozopas, K. M., Samos, C. H. and Nusse, R.** (1998). DWnt-2, a Drosophila Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate. *Genes Dev.* **12**, 1155–65.
- Kreisköther, N., Reichert, N., Buttgereit, D., Hertenstein, A., Fischbach, K. F. and Renkawitz-Pohl, R.** (2006). Drosophila Rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the Sls isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 93–106.
- Kuckwa, J., Fritzen, K., Buttgereit, D., Rothenbusch-Fender, S. and Renkawitz-Pohl, R.** (2016). A new level of plasticity: Drosophila smooth-like testes muscles compensate failure of myoblast fusion. *Development* **143**, 329–338.
- Law, A., Vehlow, A., Kotini, M., Dodgson, L., Soong, D., Theveneau, E., Bodo, C., Taylor, E., Navarro, C., Perera, U., et al.** (2013). Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration in vivo. **203**, 673–689.
- Lewellyn, L., Cetera, M. and Horne-Badovinac, S.** (2013). Misshapen decreases integrin levels to promote epithelial motility and planar polarity in Drosophila. *J. Cell Biol.* **200**, 721–9.
- Li, J., Zhang, S., Soto, X., Woolner, S. and Amaya, E.** (2013). ERK and phosphoinositide 3-kinase temporally coordinate different modes of actin-based motility during embryonic wound healing. *J. Cell Sci.* **126**, 5005–17.
- Li, Q., Li, S., Mana-Capelli, S., RothFlach, R. J., Danai, L. V., Amcheslavsky, A., Nie, Y., Kaneko, S., Yao, X., Chen, X., et al.** (2014). The conserved misshapen-warts-yorkie pathway acts in enteroblasts to regulate intestinal stem cells in drosophila. *Dev. Cell* **31**, 291–304.
- Linnemannstöns, K., Ripp, C., Honemann-Capito, M., Brechtel-Curth, K., Hedderich, M. and Wodarz, A.** (2014). The PTK7-related transmembrane proteins off-track and off-track 2 are co-receptors for Drosophila Wnt2 required for male fertility. *PLoS Genet.* **10**, 1-18.

- Lloyd, T. E., Verstreken, P., Ostrin, E. J., Phillippi, A., Lichtarge, O. and Bellen, H. J.** (2000). A Genome-Wide Search for Synaptic Vesicle Cycle Proteins in *Drosophila*. *Neuron* **26**, 45–50.
- Lüchtenborg, A.-M., Solis, G. P., Egger-Adam, D., Koval, A., Lin, C., Blanchard, M. G., Kellenberger, S. and Katanaev, V. L.** (2014). Heterotrimeric Go protein links Wnt-Frizzled signaling with ankyrins to regulate the neuronal microtubule cytoskeleton. *Development* **141**, 3399–409.
- Luo, J., Zuo, J., Wu, J., Wan, P., Kang, D., Xiang, C., Zhu, H. and Chen, J.** (2015). In vivo RNAi screen identifies candidate signaling genes required for collective cell migration in *Drosophila* ovary. *Sci. China Life Sci.* **58**, 379–389.
- Lyulcheva, E., Taylor, E., Michael, M., Vehlows, A., Tan, S., Fletcher, A., Krause, M. and Bennett, D.** (2008). *Drosophila* pico and its mammalian ortholog lamellipodin activate serum response factor and promote cell proliferation. *Dev. Cell* **15**, 680–90.
- Ma, D., Yang, C., McNeill, H., Simon, M. A. and Axelrod, J. D.** (2003). Fidelity in planar cell polarity signalling. *Nature* **421**, 543–547.
- Maj, E., Künneke, L., Loresch, E., Grund, A., Melchert, J., Pieler, T., Aspelmeier, T. and Borchers, A.** (2016). Controlled levels of canonical Wnt signaling are required for neural crest migration. *Dev. Biol.* **417**, 77–90.
- Majumdar, S., Gong, E. M., Vizio, D. Di, Dreyfuss, J., Degraff, D. J., Hager, M. H., Park, P. J., Bellmunt, J., Matusik, R. J., Rosenberg, J. E., et al.** (2013). Loss of Sh3gl2 / Endophilin A1 Is a Common Event in Urothelial Carcinoma that Promotes Malignant Behavior. *Neoplasia* **15**, 749–760.
- Mansfield, S. G., Al-Shirawi, D. Y., Ketchum, a S., Newbern, E. C. and Kiehart, D. P.** (1996). Molecular organization and alternative splicing in zipper, the gene that encodes the *Drosophila* non-muscle myosin II heavy chain. *J. Mol. Biol.* **255**, 98–109.
- Maung, S. M. T. W. and Jenny, A.** (2011). Planar cell polarity in *Drosophila*. *Organogenesis* **7**, 165–179.
- Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Buff, E. and Skeath, J. B.** (1998). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* **125**, 4379–89.

- Middleton, C. A., Nongthomba, U., Parry, K., Sweeney, S. T., Sparrow, J. C. and Elliott, C. J. H.** (2006). Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol.* **4**, 17.
- Mirkovic, I., Gault, W. J., Rahnama, M., Jenny, A., Gaengel, K., Bessette, D., Gottardi, C. J., Verheyen, E. M. and Mlodzik, M.** (2011). Nemo kinase phosphorylates  $\beta$ -catenin to promote ommatidial rotation and connects core PCP factors to E-cadherin- $\beta$ -catenin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 665–72.
- Mishra, A. K., Sachan, N., Mutsuddi, M. and Mukherjee, A.** (2015). Kinase active Misshapen regulates Notch signaling in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Res.* **339**, 51–60.
- Montell, D. J.** (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 13–24.
- Montell, D. J., Yoon, W. H. and Starz-Gaiano, M.** (2012). Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 631–45.
- Moore, L. A., Broihier, H. T., Doren, M. Van, Lunsford, L. B., Lehmann, R., Van Doren, M., Lunsford, L. B. and Lehmann, R.** (1998). Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* **125**, 667–678.
- Muha, V. and Müller, H.-A. J.** (2013). Functions and Mechanisms of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signalling in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 5920–37.
- Müller, H. a, Samanta, R. and Wieschaus, E.** (1999). Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the frizzled genes. *Development* **126**, 577–586.
- Muñoz-Soriano, V., Belacortu, Y. and Paricio, N.** (2012). Planar cell polarity signaling in collective cell movements during morphogenesis and disease. *Curr. Genomics* **13**, 609–22.
- Nagaosa, K., Okada, R., Nonaka, S., Takeuchi, K., Fujita, Y., Miyasaka, T., Manaka, J., Ando, I. and Nakanishi, Y.** (2011). Integrin  $\beta$  v-mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.* **286**, 25770–25777.

- Nanda, S., DeFalco, T. J., Loh, S. H. Y., Phochanukul, N., Camara, N., Van Doren, M. and Russell, S.** (2009). Sox100B, a Drosophila group E Sox-domain gene, is required for somatic testis differentiation. *Sex Dev.* **3**, 26–37.
- Ng, J.** (2012). Wnt/PCP proteins regulate stereotyped axon branch extension in Drosophila. *Development* **139**, 165–77.
- Nusse, R. and Varmus, H.** (1982). Many tumors induced by mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host chromosome. *Cell* **31**, 99–109.
- Olsen, S. K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A. V., Ornitz, D. M., Goldfarb, M. and Mohammadi, M.** (2003). Fibroblast Growth Factor (FGF) Homologous Factors Share Structural but Not Functional Homology with FGFs. *J. Biol. Chem.* **278**, 34226–34236.
- Önel, S. F., Rust, M. B., Jacob, R. and Renkawitz-Pohl, R.** (2014). Tethering membrane fusion: Common and different players in myoblasts and at the synapse. *J. Neurogenet.* 1–30.
- Palmer, R. H., Fessler, L. I., Edeen, P. T., Madigan, S. J., McKeown, M. and Hunter, T.** (1999). DFak56 is a novel Drosophila melanogaster focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 35621–9.
- Paricio, N., Feiguin, F., Boutros, M., Eaton, S. and Mlodzik, M.** (1999). The Drosophila STE20-like kinase Misshapen is required downstream of the Frizzled receptor in planar polarity signaling. *EMBO J.* **18**, 4669–4678.
- Park, C. H., Hahm, E. R., Lee, J. H., Jung, K. C., Rhee, H. S. and Yang, C. H.** (2005). Ionomycin downregulates beta-catenin/Tcf signaling in colon cancer cell line. *Carcinogenesis* **26**, 1929–33.
- Pegoraro, C. and Monsoro-Burq, A. H.** (2013). Signaling and transcriptional regulation in neural crest specification and migration: Lessons from xenopus embryos. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 247–259.
- Peradziryi, H., Kaplan, N. a, Podleschny, M., Liu, X., Wehner, P., Borchers, A. and Tolwinski, N. S.** (2011). PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J.* **30**, 3729–40.

- Peradziryi, H., Tolwinski, N. S. and Borchers, A.** (2012). The many roles of PTK7: A versatile regulator of cell-cell communication. *Arch. Biochem. Biophys.* **524**, 71–76.
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J.** (2004). A Dicer-2-dependent 80S complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* **117**, 83–94.
- Pipes, G. C. T., Creemers, E. E. and Olson, E. N.** (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* **20**, 1545–56.
- Pocha, S. M. and Montell, D. J.** (2014). Cellular and Molecular Mechanisms of Single and Collective Cell Migrations in *Drosophila*: Themes and Variations. *Annu. Rev. Genet.* **48**, 295–318.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N. and Schulz, R. A.** (1995). A Series of Mutations in the D-MEF2 Transcription Factor Reveal Multiple Functions in Larval and Adult Myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **171**, 169–181.
- Reig, G., Pulgar, E. and Concha, M. L.** (2014). Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* **141**, 1999–2013.
- Reim, I., Hollfelder, D., Ismat, A. and Frasch, M.** (2012). The FGF8-related signals Pyramus and Thisbe promote pathfinding, substrate adhesion, and survival of migrating longitudinal gut muscle founder cells. *Dev. Biol.* **368**, 28–43.
- Reim, G., Hruzova, M., Goetze, S. and Basler, K.** (2014). Protection of Armadillo/ $\beta$ -Catenin by Armless, a Novel Positive Regulator of Wingless Signaling. *PLoS Biol.* **12**,.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, a and Hafen, E.** (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev.* **10**, 2759–2768.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. and Nusse, R.** (1987). The *Drosophila* homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649–657.
- Ríos-Barrera, L. D. and Riesgo-Escovar, J. R.** (2013). Regulating cell morphogenesis: The *drosophila* jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* **51**, 147–162.



- Roca-Cusachs, P., Sunyer, R. and Trepats, X.** (2013). Mechanical guidance of cell migration: Lessons from chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 543–549.
- Rousset, R., Mack, J. a, Wharton, K. a, Axelrod, J. D., Cadigan, K. M., Fish, M. P., Nusse, R. and Scott, M. P.** (2001). Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev.* **15**, 658–71.
- Roussos, E. T., Condeelis, J. S. and Patsialou, A.** (2011). Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 573–587.
- Rudolf, A., Hübinger, C., Hüsken, K., Vogt, A., Rebscher, N., Önel, S. F., Renkawitz-Pohl, R. and Hassel, M.** (2013). The Hydra FGFR, Kringelchen, partially replaces the Drosophila Heartless FGFR. *Dev. Genes Evol.* **223**, 159–169.
- Sato, a, Kojima, T., Ui-Tei, K., Miyata, Y. and Saigo, K.** (1999). Dfrizzled-3, a new Drosophila Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in wingless hypomorphic mutants. *Development* **126**, 4421–30.
- Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M. and Hampe, W.** (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* **368**, 95–9.
- Seifert, J. R. K. and Mlodzik, M.** (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 126–38.
- Sen, A., Yokokura, T., Kankel, M. W., Dimlich, D. N., Manent, J., Sanyal, S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2011). Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila links Smn to FGF signaling. *J. Cell Biol.* **192**, 481–495.
- Serrels, A., Canel, M., Brunton, V. G. and Frame, M. C.** (2011). Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: Insights from in vivo imaging. *Cell Adh. Migr.* **5**, 360–365.
- Shaw, T. J. and Martin, P.** (2016). Wound repair: A showcase for cell plasticity and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 29–37.
- Shilo, B. Z.** (2014). The regulation and functions of MAPK pathways in Drosophila. *Methods* **68**, 151–159.
- Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y. and Saigo, K.** (1993). Two FGF-receptor homologues of Drosophila: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* **117**, 751–761.

- Simons, M. and Mlodzik, M.** (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 517–40.
- Sluss, H. K. and Davis, R. J.** (1997). Embryonic morphogenesis signaling pathway mediated by JNK targets the transcription factor JUN and the TGF-beta homologue decapentaplegic. *J. Cell. Biochem.* **67**, 1–12.
- Smallwood, P. M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Macke, J. P., Hendry, S. H., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. a and Nathans, J.** (1996). Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9850–7.
- Sonnenblick, B. P.** (1941). Germ Cell Movements and Sex Differentiation of the Gonads in the Drosophila Embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **27**, 484–9.
- Starz-Gaiano, M. and Lehmann, R.** (2001). Moving towards the next generation. *Mech. Dev.* **105**, 5–18.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M. and Levine, M.** (2004). Pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of Drosophila embryos. *Genes Dev.* **18**, 687–699.
- Stern, C.** (1941). The Growth of Testes in Drosophila I. The relation between vas deferens and testis within various species. *J. Exp. Zool.* **87**, 113–158.
- Stern, C. and Hador, E.** (1939). The Relation Between the Color of Testes and Vasa Efferentia in Drosophila. *Genetics* **24**, 162–179.
- Su, Y. C., Treisman, J. E. and Skolnik, E. Y.** (1998). The Drosophila Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 2371–2380.
- Susic-Jung, L., Hornbruch-freitag, C., Kuckwa, J., Rexer, K., Lammel, U. and Renkawitz-Pohl, R.** (2012). Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.* **370**, 86–97.
- Sutherland, D., Samakovlis, C. and Krasnow, M. A.** (1996). branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091–1101.

- Swaminathan, A., Barnes, V. L., Fox, S., Gammouh, S. and Pile, L. A.** (2012). Identification of Genetic Suppressors of the Sin3A Knockdown Wing Phenotype. *PLoS One* **7**,.
- Theveneau, E., Marchant, L., Kuriyama, S., Gull, M., Moepps, B., Parsons, M. and Mayor, R.** (2010). Collective Chemotaxis Requires Contact-Dependent Cell Polarity. *Dev. Cell* **19**, 39–53.
- Thomas, C. and Strutt, D.** (2012). The roles of the cadherins Fat and Dachshous in planar polarity specification in Drosophila. *Dev. Dyn.* **241**, 27–39.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S. and Matsumura, F.** (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J. Cell Biol.* **164**, 427–439.
- Treisman, J. E., Ito, N. and Rubin, G. M.** (1997). misshapen encodes a protein kinase involved in cell shape control in Drosophila. *Gene* **186**, 119–125.
- Tuttle, A. M., Hoffman, T. L. and Schilling, T. F.** (2014). Rabconnectin-3a regulates vesicle endocytosis and canonical Wnt signaling in zebrafish neural crest migration. *PLoS Biol.* **12**, e1001852.
- van Amerongen, R. and Nusse, R.** (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205–3214.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M. and Leptin, M.** (1998). The Drosophila protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol. Cell* **2**, 515–525.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U. and Jäckle, H.** (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent Drosophila neuroblasts. *Dev. Dyn.* **224**, 403–412.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* **6**, 154–161.
- Wehrli, M., Dougan, S. T., Caldwell, K., O’Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, a and DiNardo, S.** (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527–530.
- Welter, H., Kampfer, C., Lauf, S., Feil, R., Schwarzer, J. U., Köhn, F.-M. and Mayerhofer, A.** (2013). Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritu-

- bular cells in infertility patients. *Andrology* **1**, 318–324.
- Wenzek, F.** (2013). Die Entwicklung der Muskulatur des männlichen Reproduktionssystems in Hinblick auf den FGF-Signalweg.
- Weston, C. R., Wong, A., Hall, J. P., Goad, M. E. P., Flavell, R. A. and Davis, R. J.** (2003). JNK initiates a cytokine cascade that causes Pax2 expression and closure of the optic fissure. *Genes Dev.* **17**, 1271–1280.
- Xie, H., Pallero, M. a, Gupta, K., Chang, P., Ware, M. F., Witke, W., Kwiatkowski, D. J., Lauffenburger, D. a, Murphy-Ullrich, J. E. and Wells, a** (1998). EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J. Cell Sci.* **111**, 615–624.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R. and Darnell, J. E.** (1996). Identification of a Stat Gene That Functions in Drosophila Development. *Cell* **84**, 421–430.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. and Dearolf, C. R.** (1997). viking : identification and characterization of a second type IV collagen in Drosophila. *Gene* **198**, 17–25.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., et al.** (2000). MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7272–7.
- Yung, Y., Dolginov, Y., Yao, Z., Rubinfeld, H., Michael, D., Hanoch, T., Roubini, E., Lando, Z., Zharhary, D. and Seger, R.** (1997). Detection of ERK activation by a novel monoclonal antibody. *FEBS Lett.* **408**, 292–6.
- Zeng, Y. a and Verheyen, E. M.** (2004). Nemo is an inducible antagonist of Wingless signaling during Drosophila wing development. *Development* **131**, 2911–20.
- Zeng, W., Wharton, K. a, Mack, J. a, Wang, K., Gadbaw, M., Suyama, K., Klein, P. S. and Scott, M. P.** (2000). naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature* **403**, 789–795.

**10. Anhang****10.1 Abkürzungsverzeichnis**

Apc	APC-like
APF	nach der Verpuppung (after puparium formation)
Arm	Armadillo
Arr	Arrow
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bnl	Branchless
Btl	Breathless
CadN	Cadherin-N
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
Csw	Corkscrew
Dcr-2	Dicer-2
de	Ductus ejaculatus
Dgo	Diego
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Drk	Downstream of receptor kinase
Duf	Dumbfounded
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EGFR	Epidermaler Wachstums-Faktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
Erk	extracellular-signal-related protein kinase
Fak	Focal adhesion kinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
FC	Founder Zelle (founder cell)
FCM	Fusionskompetenter Myoblast (fusion competent myoblast)
FGF	Fibroblasten Wachstums-Faktor (fibroblast growth factor)
FGFR	FGF Rezeptor
Fi	Fusionsindex
Fz2	Frizzled2
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Gro	Groucho



---

GS	Genitalimaginalscheibe
Hbs	Hibris
HS-Lösung	Hybridisierungslösung
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
Htl	Heartless
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
JAK	Januskinase
JNK	c-jun amino-terminal kinase
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MAPKKKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase Kinase
mCD8	Mäuse CD8 (mouse CD8)
Mef2	Myocyte enhancer factor 2
min	Minuten
MLCK	myosin light chain kinase
Mo	Morphologie
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
Mrtf	Myocardin-related transcription factor
Msn	Misshapen
Mu	Muskulatur
N	Zellkern (Nukleus)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
neg.	Negativkontrolle
Nmo	Nemo
pa	Penis apparatus
Pan	Pangolin
PCP	planare Zellpolarität (planar cell polarity)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pg	Paragonium
PGCs	Keimzell-Vorläufer (primordial germ cells)
Pk	Prickle

pos.	Positivkontrolle
Pyr	Pyramus
RNAi	RNA-Interferenz
Rst	Roughest
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sec	Sekunden
Sgg	Shaggy
Sgs5	Salivary gland secretion 5
Sns	Sticks and Stones
SP	Spermienpumpe
Stan	Starry night
STAT92E	Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E
te	Testis
Ths	Thisbe
Tm	Schmelztemperatur (melting temperature)
Tpl94D	Transition protein-like 94D
Trol	Terribly reduced optic lobes
UAS	Upstream Activating Sequence
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vang	Van Gogh
vs	Seminal Vesicle
wt	wildtypisch

## 10.2 GFP-Trap Linien

**Tabelle A1:** Ergebnisse des GFP-Trap Screens

<b>Wnt Signalweg</b>
Frizzled2 (CB02997)*
30 h APF: Epithel von auswachsenden PG und VS, Myoblasten auf VS und PG; evtl. Myotubenkerne auf Testis, terminales Epithel im Testis
Adult: keine Expression in DE; unspezifisch in SP, TE; Epithelzellkerne des PG, VS
Frizzled3 (G00357)**
30 h APF: keine Expression
Adult: keine Expression in DE, VS; unspezifisch in SP, TE; Epithelzellkerne des PG
Dishevelled (BL41774)
30 h APF: ubiquitär auf GS; Cytoplasma von Keimzellen
Adult: unspezifisch in SP, ubiquitär in DE, PG, VS; Cytoplasma von Keimzellen

---

Armadillo (BL8555)

30 h APF: schwach ubiquitär auf GS; schwach in Keimzellen

Adult: keine Expression in DE, PG; unspezifisch in SP, VS, TE

---

## Armadillo (BL8556)

30 h APF: keine Expression

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

---

## Shaggy (P01776, ZCL1626\*\*, ZCL1912)

30 h APF: ubiquitär auf GS, auch in Myoblasten; ubiquitär im Testis

Adult: ubiquitär in SP, DE, PG, VS; Cytoplasma von Keimzellen

---

## Shaggy (G00015)\*\*

30 h APF: ubiquitär auf GS, auch in Myoblasten; ubiquitär im Testis

Adult: Epithel von DE, PG, VS; Zellkerne in SP; Cystzellen und Cytoplasma von Keimzellen

---

## Nemo (BL36194, BL58656)

30 h APF: keine Expression auf GS; unspezifisch im Testis, evtl. „waste bags“

Adult: keine Expression in DE, VS, TE; unspezifisch in SP; ubiquitär in PG

---

## Nemo (CB02015)\*\*

30 h APF: Epithel von auswachsenden VS, PG, DE; in Keimzellkernen

Adult: keine Expression in DE, PG; unspezifisch in SP; in Keimbahnstammzellen; Epithel vom VS

---

## Nemo (BL38664)

30 h APF: keine Expression auf GS; ubiquitär im Testis

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

---

---

**JAK/STAT Signalweg**

---

## Stat92E (BL38670)

30 h APF: ubiquitär auf GS; Cystzellen im Testis

Adult: ubiquitär in SP; Epithel von DE, PG; Cystzellen im TE

---

---

**EZM Komponenten**

---

## Trol (ZCL1700, ZCL1973\*\*)

30 h APF: keine Expression auf GS; schwach in der Testishülle

Adult: Muskeln in SP, DE, PG, VS; in der Testishülle

---

## Viking (CC00791, G00454\*\*)

30 h APF: keine Expression auf GS; in der Testishülle

Adult: Muskeln in SP, DE, PG, VS; in der Testishülle

---

## Viking (G00205)

30 h APF: keine Expression auf GS; in Keimzellkernen

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

---

---

**Kinasen**

---

## Fak (YD0233)

30 h APF: ubiquitär auf GS; Cytoplasma von Keimzellen

Adult: unspezifisch in SP; keine Expression in DE, PG, VS, TE

---

Misshapen (CC00523)

30 h APF: keine Expression

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

### Proteine mit Migrations-Relevanz in Säugetieren

Endophilin A (BL56298)

30 h APF: keine Expression auf GS; in Keimzellen

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

Mrtf (BL30678, BL56442)

30 h APF: keine Expression auf GS; in Keimzellkernen

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

Mrtf (BL52180)

30 h APF: keine Expression auf GS; ubiquitär im Testis

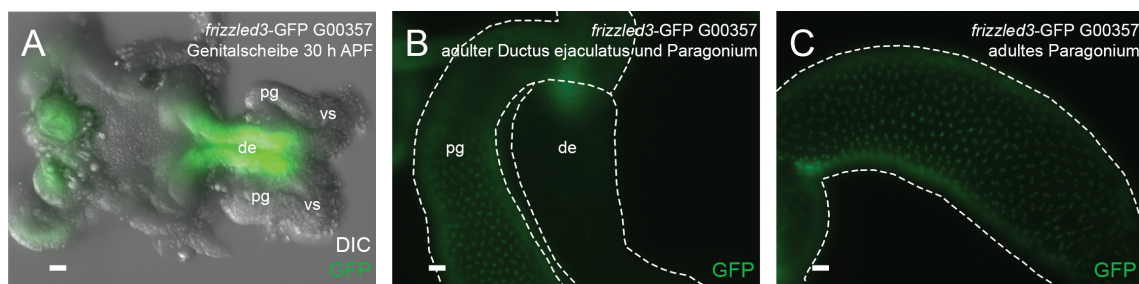
Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

Pico (BL43799)

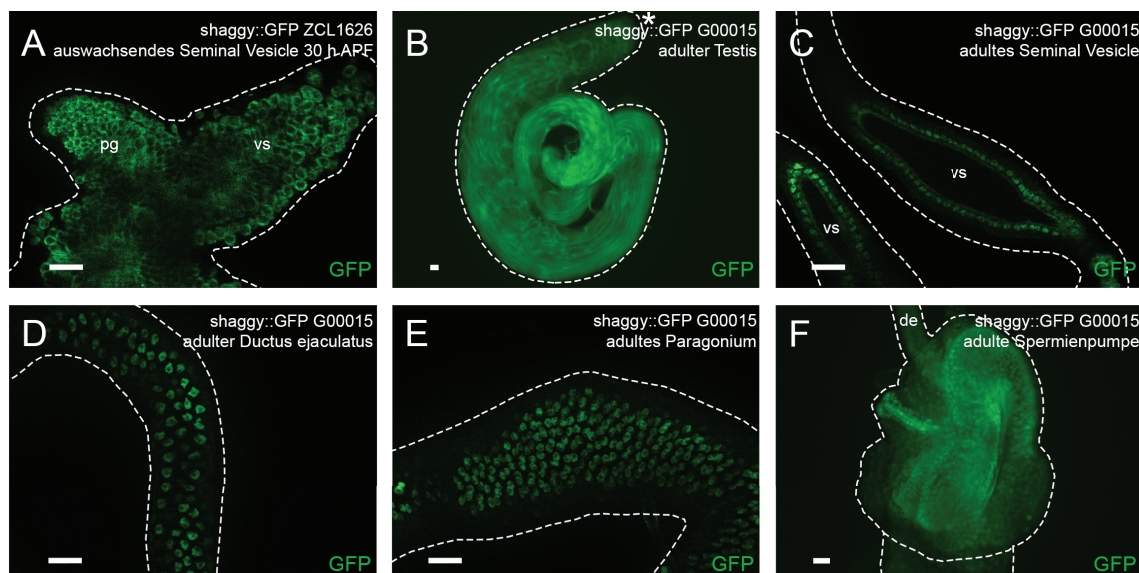
30 h APF: keine Expression auf GS; unspezifisch im Testis, evtl. „waste bags“

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

GS = Genitalscheibe; SP = Spermiumpumpe; PG = Paragonium; DE = Ductus ejaculatus; VS = Seminal Vesicle; TE = Testis; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang

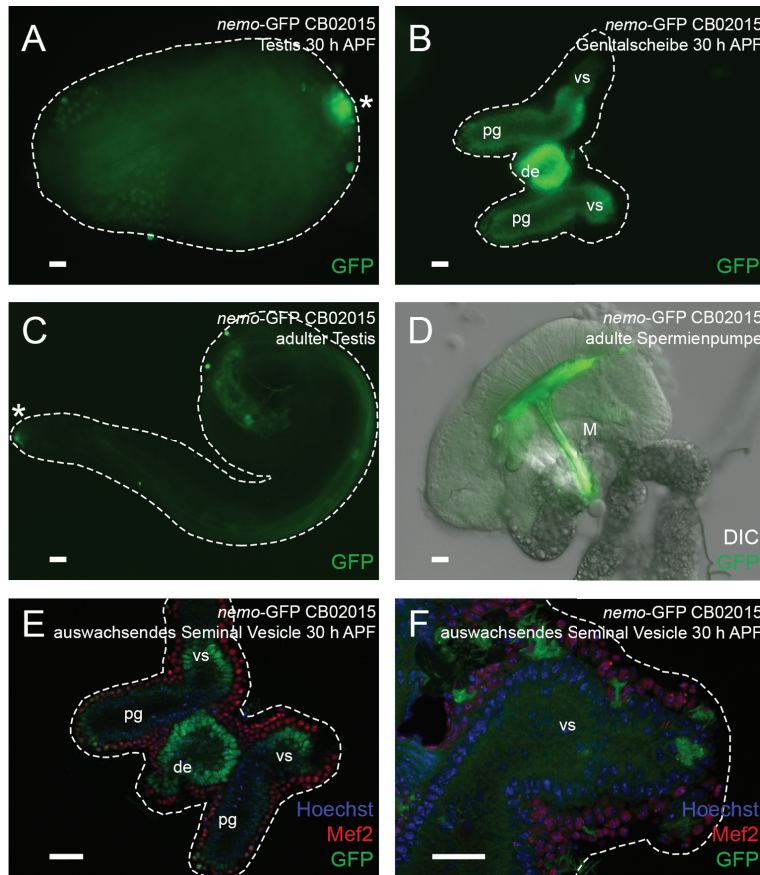


**Abbildung A1: *frizzled3*-GFP ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv.** Genitalscheiben bei 30 h APF zeigen eine GFP-Expression im sich entwickelnden Ductus ejaculatus (de) (A). Im adulten Reproduktionstrakt ist die GFP-Expression auf die Epithelzellkerne der Paragonien (pg) beschränkt, der Ductus ejaculatus zeigt kein GFP-Signal (B, C). vs = Seminal Vesicle. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

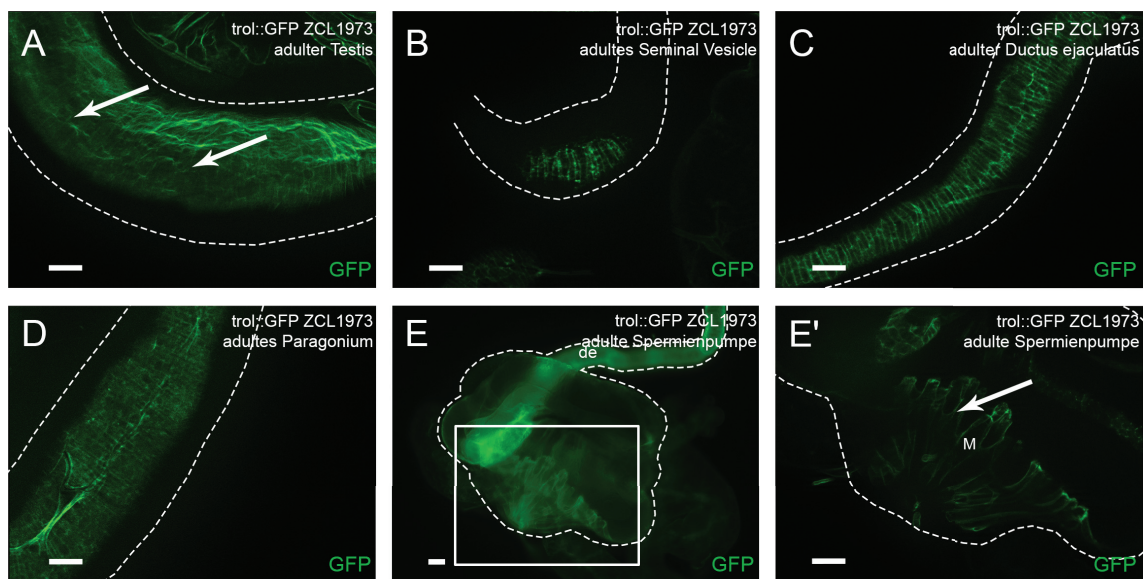




**Abbildung A2: Zwei *Shaggy::GFP* Linien zeigen unterschiedliche Expressionsmuster.** Genitalscheiben der Linie ZCL1626 weisen *Shaggy::GFP* im Cytoplasma aller Zellen der sich entwickelnden Seminal Vesicle (vs) sowie Paragonien (pg) auf (A). Die Fliegenlinie G00015 zeigt eine ubiquitäre GFP-Expression in adulten Testes (B). Im adulten Seminal Vesicle (C) sowie dem Ductus ejaculatus (D) und Paragonium (E) sind spezifische GFP-Signale in Epithelzellkernen sichtbar. Die Spermiumpumpe weist ubiquitäre GFP-Expression auf (F). de = Ductus ejaculatus. Das Sternchen markiert die Hubregion, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



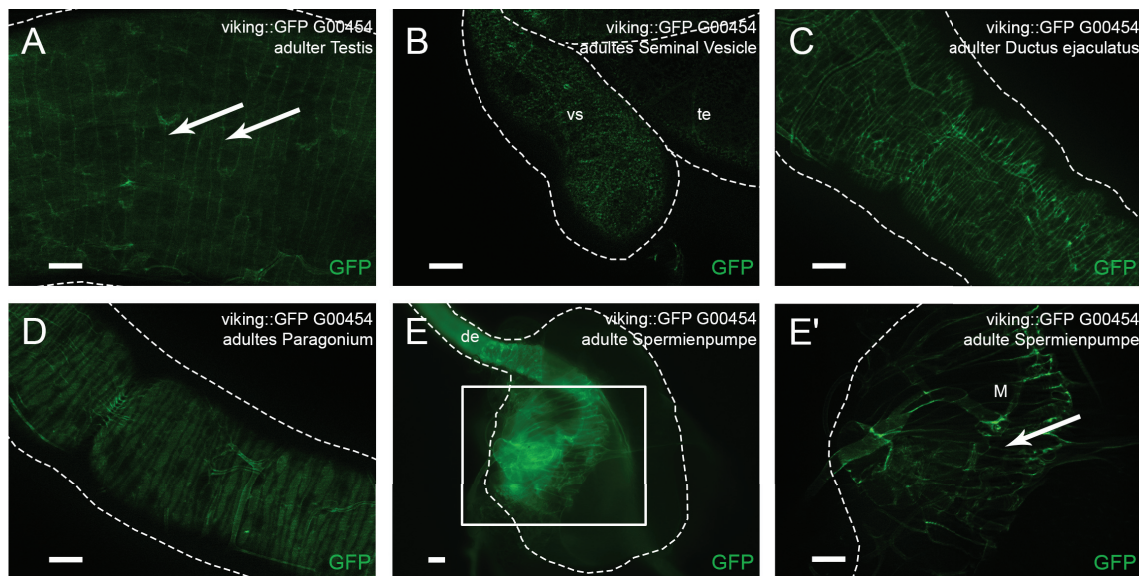
**Abbildung A3: *nemo-GFP* ist in verschiedenen Epithelien von Genitalscheiben aktiv.** Pupale Testes 30 h APF weisen eine starke Aktivierung von *nemo-GFP* in der Hubregion (Sternchen) auf (A). Das vordere Ende einer Genitalscheibe 30 h APF zeigt eine GFP-Expression in den Epithelien der sich entwickelnden Seminal Vesicles (vs), Paragonien (pg) sowie des Ductus ejaculatus (de) (B). In adulten Testes ist auch ein starkes GFP-Signal in der Hubregion (Sternchen) (C). Adulte Spermiumpumpen zeigen keine GFP-Expression in den Muskeln (M), sondern eine unspezifische Expression (D). Genitalscheiben 30 h APF zeigen keine GFP-Expression in *Mef2*-positiven Myoblasten auf den Seminal Vesicles, sondern nur in Epithelien; Hoechst markiert die Zellkerne (E-F). Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



**Abbildung A4: *Trol::GFP* markiert die Muskeln des männlichen Reproduktionstraktes.** Die adulte Testishülle weist ein starkes GFP-Signal auf. Hierbei sind teilweise Signale in der Nähe der Membranen der einzelnen Muskeln erkennbar (Pfeile) (A). Auch adulte Seminal Vesicles (B) und der Ductus ejaculatus (C) zeigen *Trol::GFP* spezifisch um die Muskeln. Paragonien exprimieren sehr viel *Trol::GFP*, sodass die Muskeln kaum



erkennbar sind (D). Die Spermienpumpe weist ebenfalls viel Trol::GFP auf (E), jedoch ist ein klares GFP-Signal in der Nähe der Membranen der Muskeln (M) erkennbar (Pfeil) (E'). de = Ductus ejaculatus. Der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



**Abbildung A5: Viking::GFP markiert die Muskeln der männlichen Reproduktionsorgane.** In der adulten Testishülle sind GFP-Signale in der Nähe der Membranen der einzelnen Muskeln sichtbar (Pfeile) (A). Adulte Seminal Vesicles (vs) zeigen ein unspezifisches GFP-Signal (B). Der Ductus ejaculatus (C) sowie die Paragonien (D) zeigen Viking::GFP vermutlich in den Muskelzwischenräumen. Die Spermienpumpe zeigt ein klares GFP-Signal nahe der Membranen der Muskeln (M) (Pfeil) (E, E'). te = Testis. Der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

### 10.3 Gal4-Treiber

**Tabelle A2:** Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Gal4-Treiber

<b>Treiberlinien aus Hrdlicka et al., 2002</b>
C564-Gal4 (BL6982)**
Adult: keine Expression in SP, DE, VS, TE; sekretorische Zellen im PG
C805-Gal4 (BL6986)
Adult: keine Expression
MJ12a-Gal4 (BL6991)**
Adult: keine Expression in SP, DE, PG; in der Testishülle, aber nicht in Kernen der Pigmentzellen und der Muskeln; in der Hülle der Seminal Vesicles
MJ33a-Gal4 (BL6992)
Adult: keine Expression
T100-Gal4 (BL6997)
Adult: keine Expression in SP, DE, PG, VS; evtl. schwach in der Testishülle
<b>Treiberlinien für den Wnt Signalweg</b>
Wingless-Gal4
30 h APF: keine Expression
Frizzled2-Gal4 (BL12796)*/**

26 h bzw. 30 h APF: teilweise Epithel von auswachsendem PG, viel Hintergrund in Epithel und Myoblasten des auswachsenden VS; Myotuben auf Testis

Adult: keine Expression in DE, PG; schwach am basalen Ende des Testis; in der Hülle der Seminal Vesicles; Muskeln in SP

Keine Übereinstimmung mit Frizzled2-Antikörper

### Treiberlinien im Twist-Muster

SG24-Gal4

30 h APF: keine Expression

Adult: keine Expression in DE, PG, VS, TE; unspezifisch in SP

Tgx-Gal4

34 h APF: keine Expression

Adult: keine Expression

### Weitere Treiberlinien

H94-Gal4\*\*

30 h APF: Expression in einigen Myoblasten/Myotuben aber auch im Epithel auf auswachsenden VS; einige Myotuben auf Testis

Adult: keine Expression in DE, VS, TE; unspezifisch in SP; sekretorische Zellen im PG

Mrtf-Gal4 (BL24567)

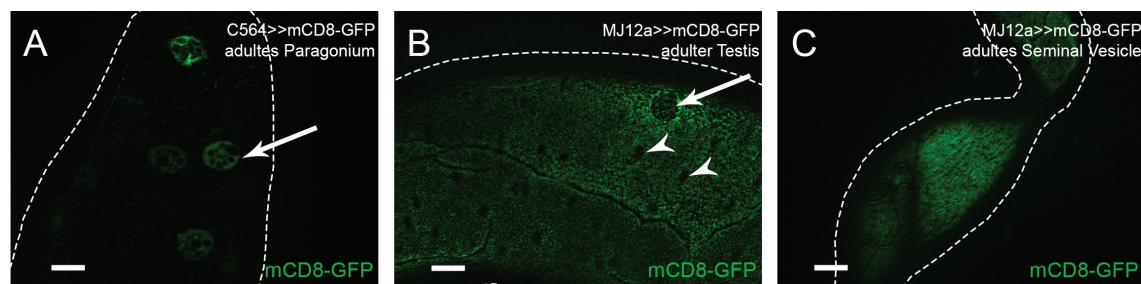
26 h APF: keine Expression

Adult: keine Expression in SP, DE, PG, VS; evtl. Cystzellen um Flagellenbündel

Pyramus-Gal4 (BL23827)

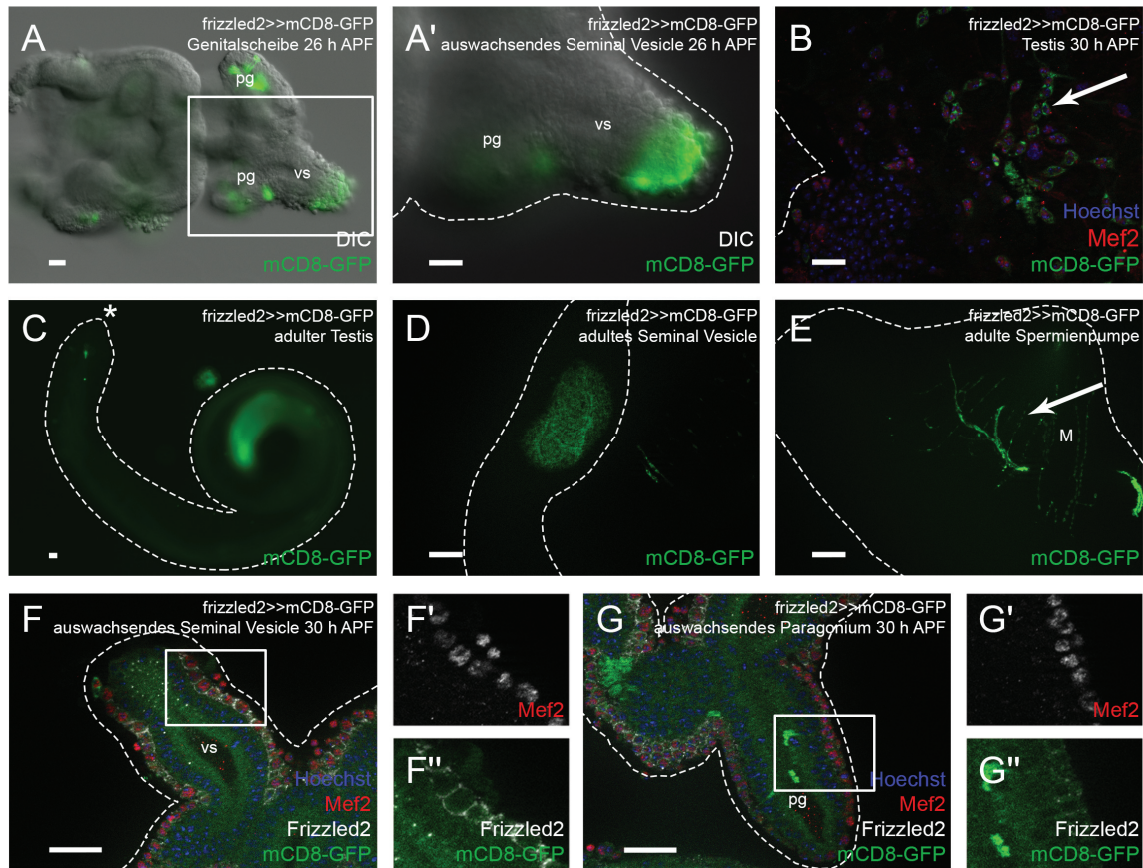
24 h APF: keine Expression

GS = Genitalscheibe; SP = Spermienspunde; PG = Paragonium; DE = Ductus ejaculatus; VS = Seminal Vesicle; TE = Testis; \* = wird näher charakterisiert; \*\* = Bildtafel im Anhang

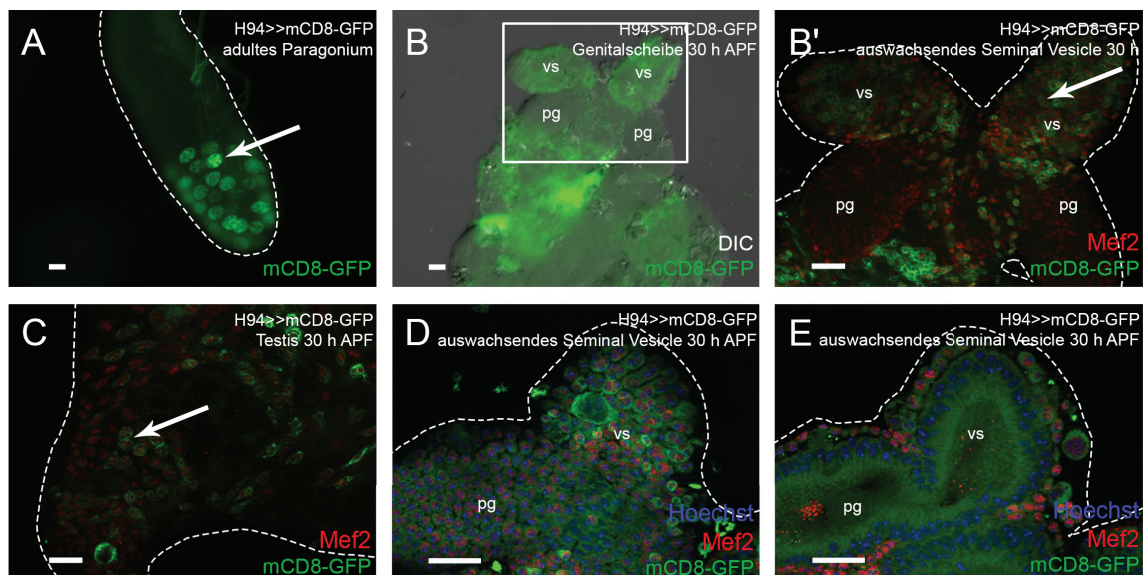


**Abbildung A6: C564-Gal4 treibt die Expression in sekretorischen Zellen des Paragoniums.** Adulte Paragonien von C564-Gal4>>UAS-mCD8-GFP exprimierenden Tieren zeigen mCD8-GFP spezifisch in den sekretorischen Zellen (Pfeil) (A). Die Expression von MJ12a-Gal4>>UAS-mCD8-GFP ist in der adulten Testishülle zu sehen, wobei die Zellkerne der Testesmuskeln (Pfeilköpfe) und Pigmentzellen (Pfeil) frei bleiben (B). Die Hülladen der adulten Seminal Vesicles dieser Tiere zeigt ein diffuses GFP-Signal (C). Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.





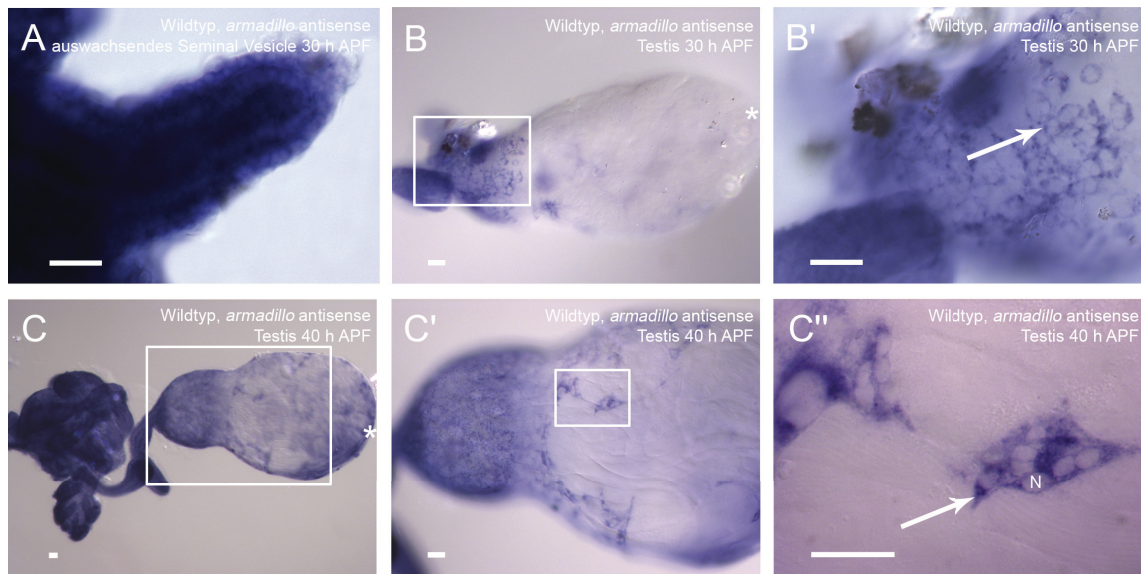
**Abbildung A7: Frizzled2-Gal4 treibt teilweise in Myotuben auf pupalen Testes.** Charakterisierung der Frizzled2-Gal4 Linie. Frizzled2-Gal4>>UAS-mCD8-GFP exprimierende Genitalscheiben bei 26 h APF weisen GFP-Signale in sich entwickelnden Paragonien (pg) sowie an der Spitze von Seminal Vesicles (vs) auf (A, A'). Pupale Testes 30 h APF weisen teilweise mCD8-GFP in Mef2-positiven Myotuben auf (Pfeil) (B). In adulten Tieren ist keine spezifische Expression im Testis vorhanden (C), das Seminal Vesicle zeigt ein diffuses GFP-Signal in der Hülle (D). In der Spermienspunde ist eine schwache Expression in der Membran der Muskeln (M) erkennbar (Pfeil) (E). Genitalscheiben 30 h APF zeigen eine sehr schwache GFP-Expression in Mef2-positiven Myoblasten sowie Frizzled2-positiven Zellen (F-F''), die einzige starke Expression ist im Epithel des auswachsenden Paragoniums erkennbar (G-G''). Das Sternchen markiert die Hubregion, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



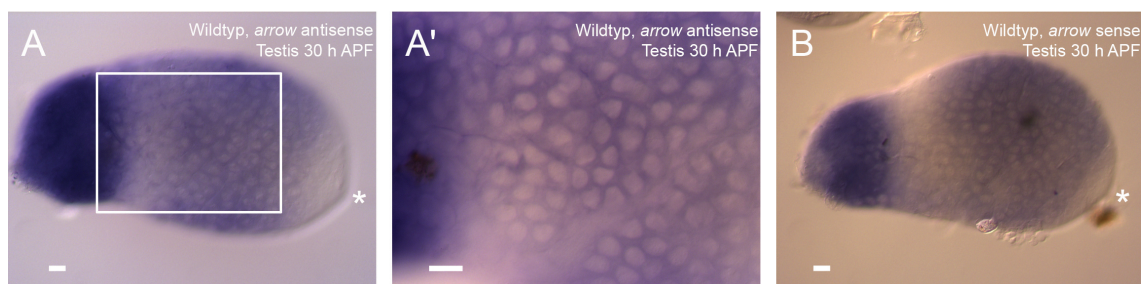
**Abbildung A8: H94-Gal4 treibt die Expression in sekretorischen Zellen des Paragoniums.** Charakterisierung der H94-Gal4 Linie. Adulte Paragonien von H94-Gal4>>UAS-mCD8-GFP exprimierenden Tieren

weisen eine spezifische mCD8-GFP-Expression in den sekretorischen Zellen auf (Pfeil) (A). Auf Genitalscheiben 30 h APF ist eine Expression in einigen Bereichen erkennbar, auch auf den auswachsenden Seminal Vesicles (vs) (B). Auf auswachsenden Seminal Vesicles (B') sowie pupalen Testes 30 h APF (C) gibt es eine teilweise Co-lokalisierung zwischen Mef2-positiven Myotuben und H94>>mCD8-GFP (Pfeile). In der Vergrößerung erkennt man jedoch eine gleichmäßig starke mCD8-GFP-Expression in allen Muskelzellen auf auswachsenden Seminal Vesicles und Paragonien (pg) sowie den darunterliegenden Epithelien (D, E). Der Kasten kennzeichnet den vergrößerten Bereich, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

#### 10.4 Kanonischer Wnt Signalweg

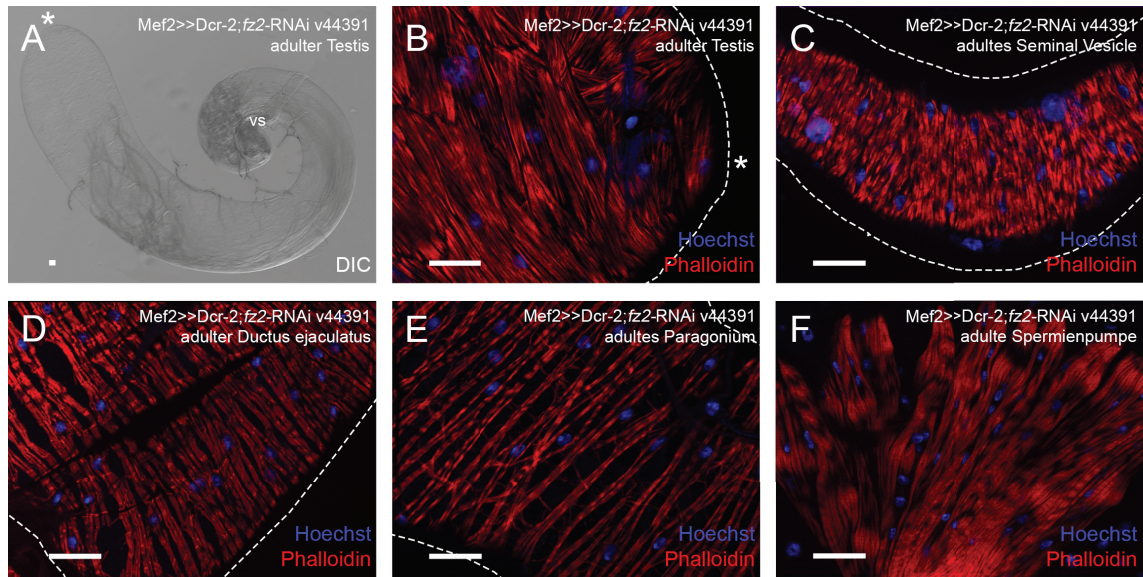


**Abbildung A9: Transkripte von *armadillo* sind in naszierenden Testes-Myotuben detektierbar.** *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Genitalscheiben und Testes mithilfe einer *armadillo* antisense-Sonde. Das auswachsende Seminal Vesicle einer Genitalscheibe 30 h APF weist Signale in allen Zellen auf (A). In der Testishülle bei 30 h APF (B, B') und 40 h APF (C, C', C'') sind *armadillo* Transkripte detektierbar. In beiden Fällen sind die Signale im Cytoplasma der naszierenden Myotuben (Pfeile) (B', C''), die Zellkerne (Nuklei, N) bleiben frei. Sternchen markieren die Hubregionen, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

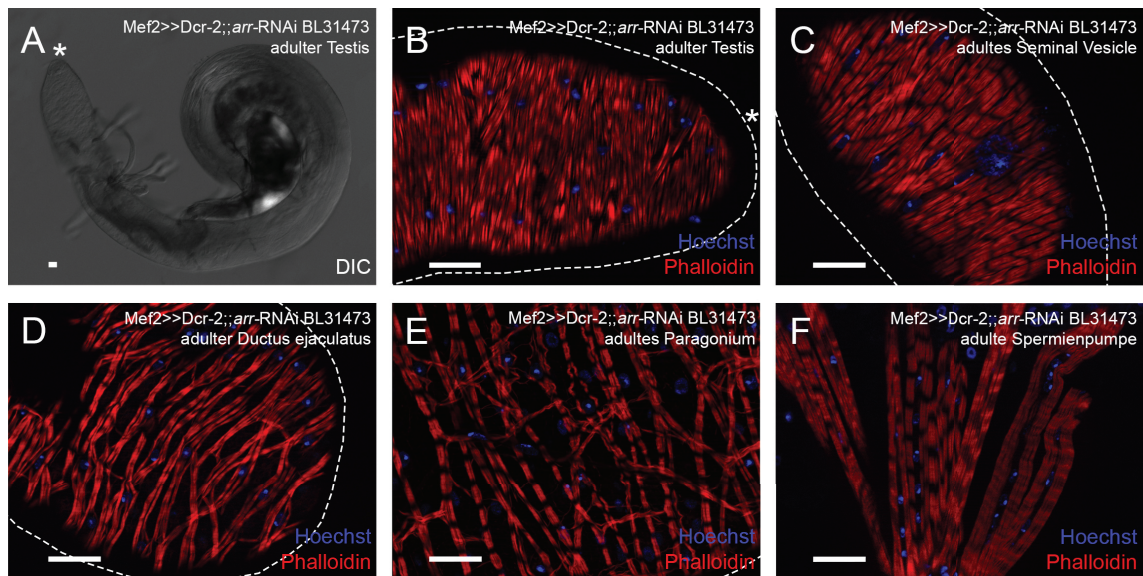


**Abbildung A10: Beide *arrow*-Sonden zeigen Signale in Keimzellen.** *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes mithilfe von *arrow* antisense- sowie sense-Sonden. In pupalen Testes bei 30 h APF zeigt sowohl die antisense-Sonde (A, A') als auch die sense-Sonde (B) Signale im Cytoplasma der Keimzellen. Sternchen markieren die Hubregionen, Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



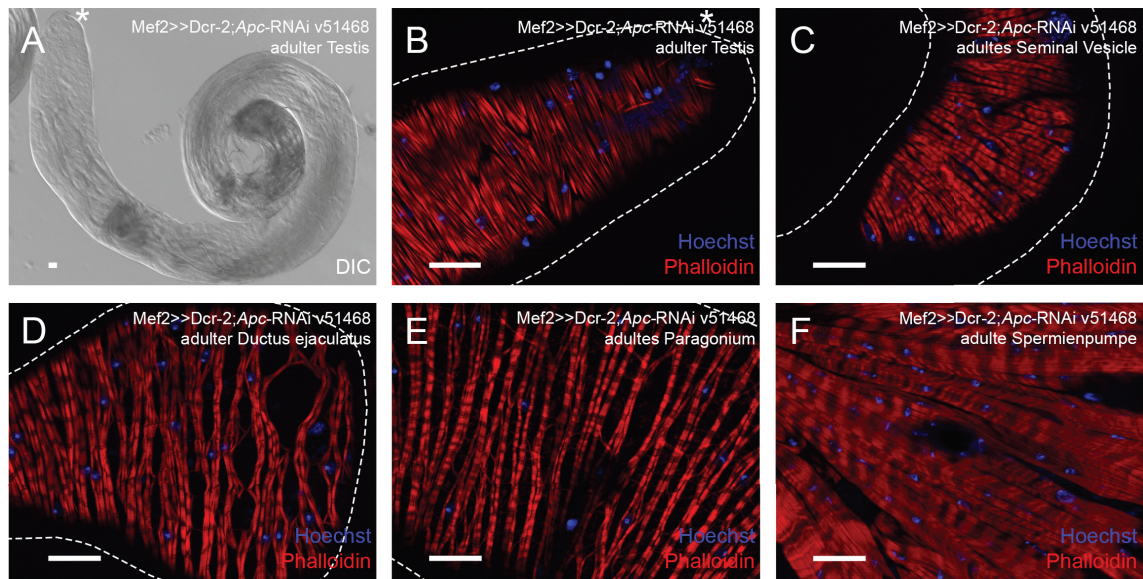


**Abbildung A11: Muskelspezifische *frizzled2*-Herunterregulation in Kombination mit *Dicer-2* führt zu leichten Defekten in der Testismuskulatur.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;fz2-RNAi* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes (A) sieht weitgehend wildtypisch aus, die Muskulatur weist leichte Defekte in der Hubregion auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) erscheinen weitgehend wildtypisch. vs = Seminal Vesicle. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

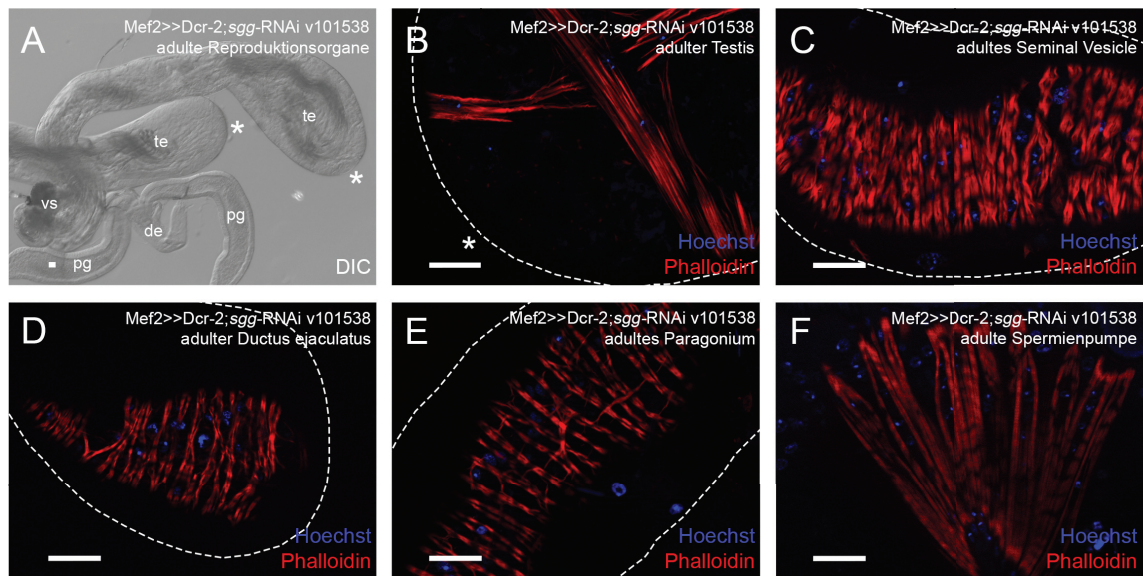


**Abbildung A12: RNAi-vermittelter knock-down von *arrow* in Muskeln ruft leichte Defekte in der Paragonienmuskulatur hervor.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;arr-RNAi* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes (A) sieht ebenso wie die Testismuskulatur (B) und die Muskeln der Seminal Vesicles (C) sowie des Ductus ejaculatus (D) wildtypisch aus. In der Paragonienmuskulatur verlaufen einige Muskeln quer zueinander (E). Die Muskeln der Spermienpumpe erscheinen weitgehend wildtypisch (F). Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

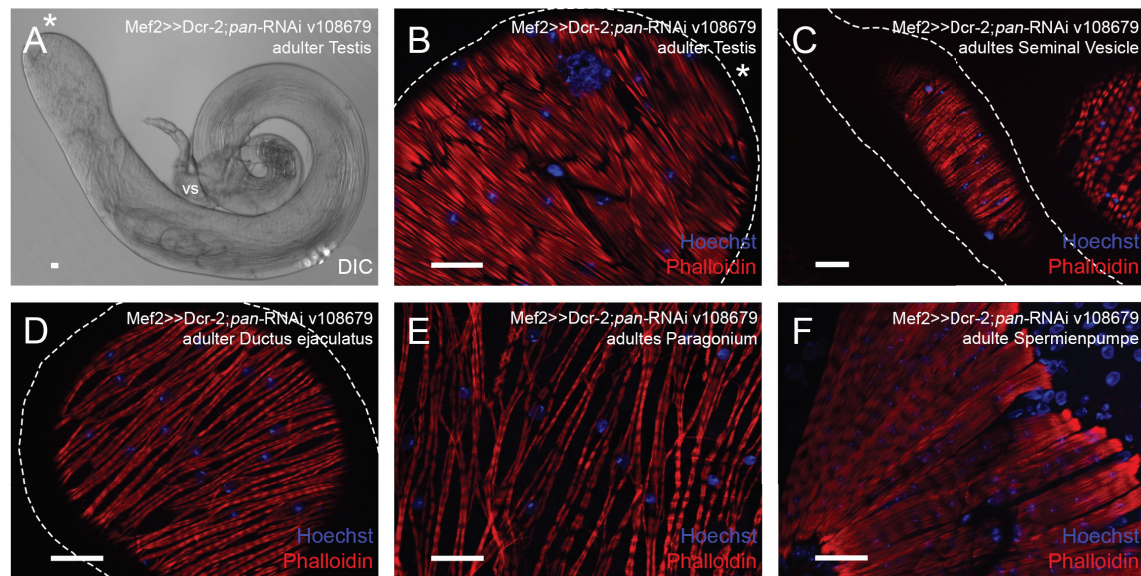




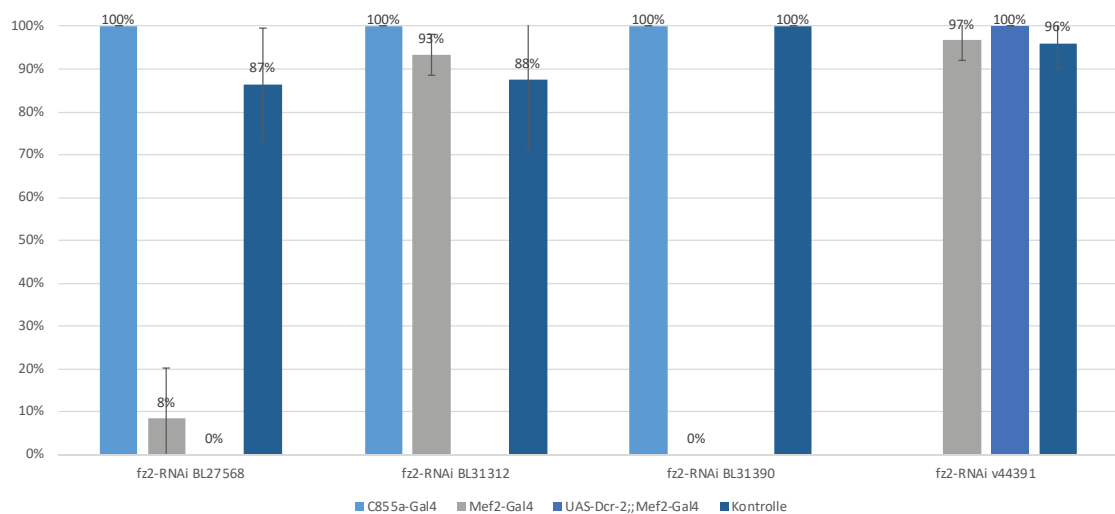
**Abbildung A13: Herunterregulation von *APC-like* in Muskeln bewirkt leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;Apc-RNAi v51468* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie des Testis (A) sieht ebenso wie die Testismuskulatur (B) und die Muskeln der Seminal Vesicles (C) wildtypisch aus. In der Muskulatur des Ductus ejaculatus sind einige Löcher zu erkennen (D). Die Paragonienmuskulatur (E) sowie die Muskeln der Spermienpumpe (F) erscheinen wildtypisch. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



**Abbildung A14: Muskelspezifischer *shaggy*-knock-down stört die Migration der Testes-Myotuben.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;sgg-RNAi v101538* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Reproduktionsorgane ist leicht gestört, der Testis (te) weist eine verdickte Spitze auf, die Paragonien (pg) sowie der Ductus ejaculatus (de) sind klein und dünn (A). In der Hubregion weist die Testismuskulatur große Löcher auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C) des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) sehen hingegen wildtypisch aus. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

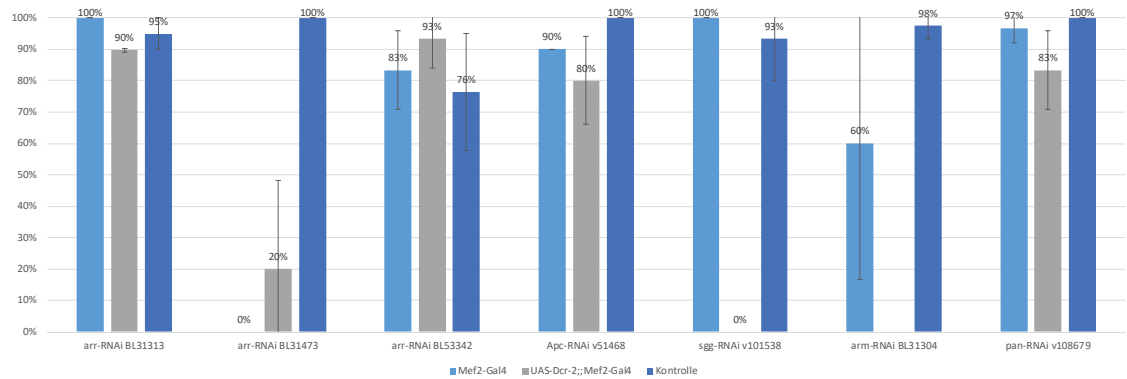


**Abbildung A15: Durch den muskelspezifischen *pangolin*-knock-down wird die Testismuskulatur leicht gestört.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*pan*-RNAi exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes erscheint wildtypisch (A), die Muskulatur weist leichte Defekte in der Hubregion auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C) des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermiumpumpe (F) sehen wildtypisch aus. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

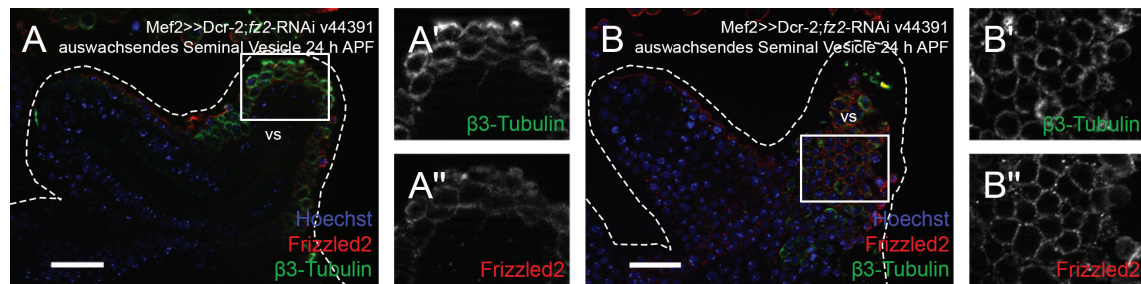


**Abbildung A16: Fertilität von Männchen nach *frizzled2*-knock-down.** Männchen mit C855a-, Mef2- oder Mef2>>Dcr-2 getriebener *fz2*-RNAi vier verschiedener Linien wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden *fz2*-RNAi-Männchen aller Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Die Herunterregulation von *fz2* durch C855a-Gal4 führt bei keiner Linie zu verminderter Fertilität, Herunterregulationen mit Mef2 oder Mef2>>Dcr-2 führen teilweise zu Sterilität. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.

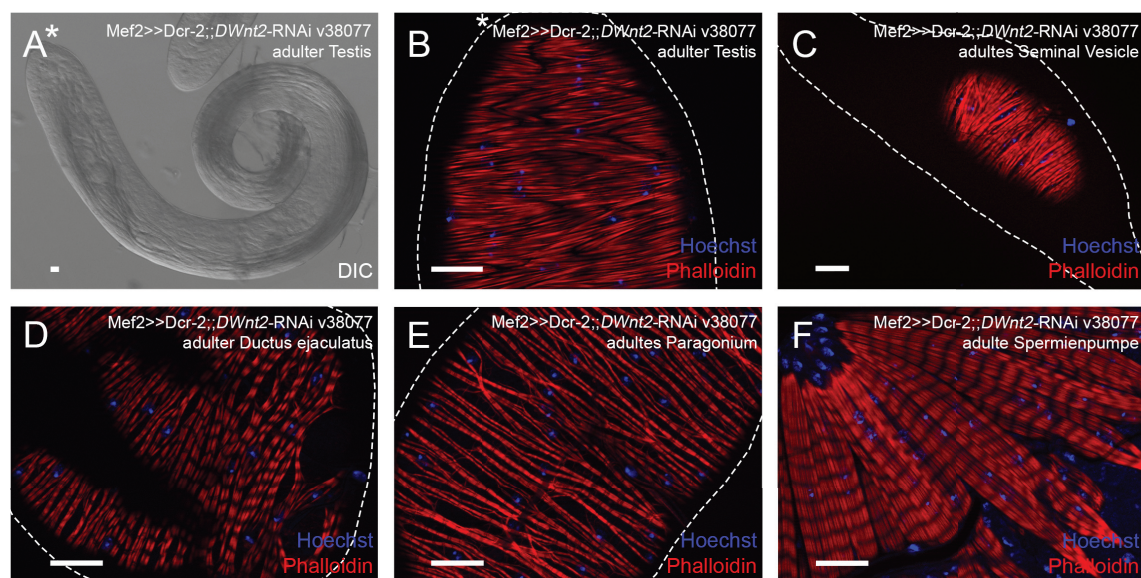




**Abbildung A17: Fertilität von Männchen nach RNAi-vermittelter Herunterregulation verschiedener Wnt Komponenten.** Männchen mit Mef2- oder Mef2>>Dcr-2 getriebener RNAi von fünf verschiedenen Komponenten des Wnt Signalweges wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden RNAi-Männchen aller Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Die muskelspezifische Herunterregulation von *arr* führt bei einer Linie zu Sterilität bzw. stark verminderter Fertilität. Herunterregulationen von *Apc* oder *pan* mit Mef2 oder Mef2>>Dcr-2 führen zu kaum verminderter Fertilität. Bei der muskelspezifischen Herunterregulation von *sgg* wird die Fertilität nur durch Dcr-2 beeinträchtigt. Die Herunterregulation von *arm* führt zu verminderter Fertilität. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.

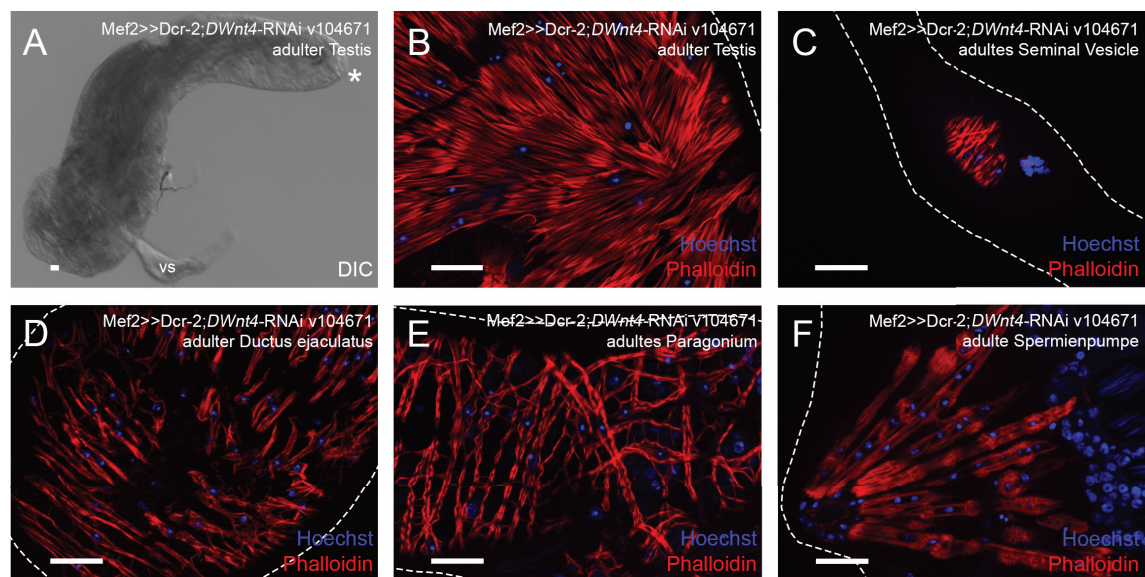


**Abbildung A18: Die RNAi-Linie v44391 führt nicht zu einer sichtbaren Herunterregulation von *frizzled2*.** Analyse von Mef2>>Dcr-2;*fz2*-RNAi exprimierenden Genitalscheiben. Hoechst markiert die Zellkerne, Myoblasten werden mithilfe von β3-Tubulin markiert. Auf auswachsenden Seminal Vesicles 24 h APF ist Frizzled2 trotz Expression von *fz2*-RNAi in Myoblasten detektierbar (A-B''). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 μm.

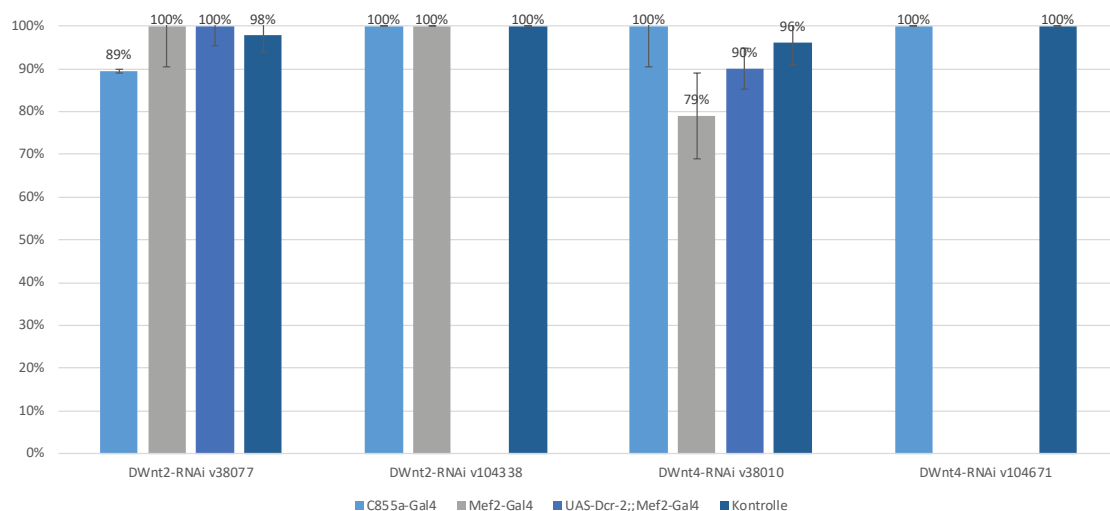


**Abbildung A19: RNAi-vermittelter knock-down von *DWnt2* in Myoblasten ruft leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus hervor.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*DWnt2*-RNAi exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie (A) sowie die Muskulatur (B) der Testes erscheint ebenso wie die Muskulatur der Seminal Vesicles (C) wildtypisch. Die

Muskulatur des Ductus ejaculatus weist teilweise Löcher auf (D), die Muskeln der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) sehen wildtypisch aus. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



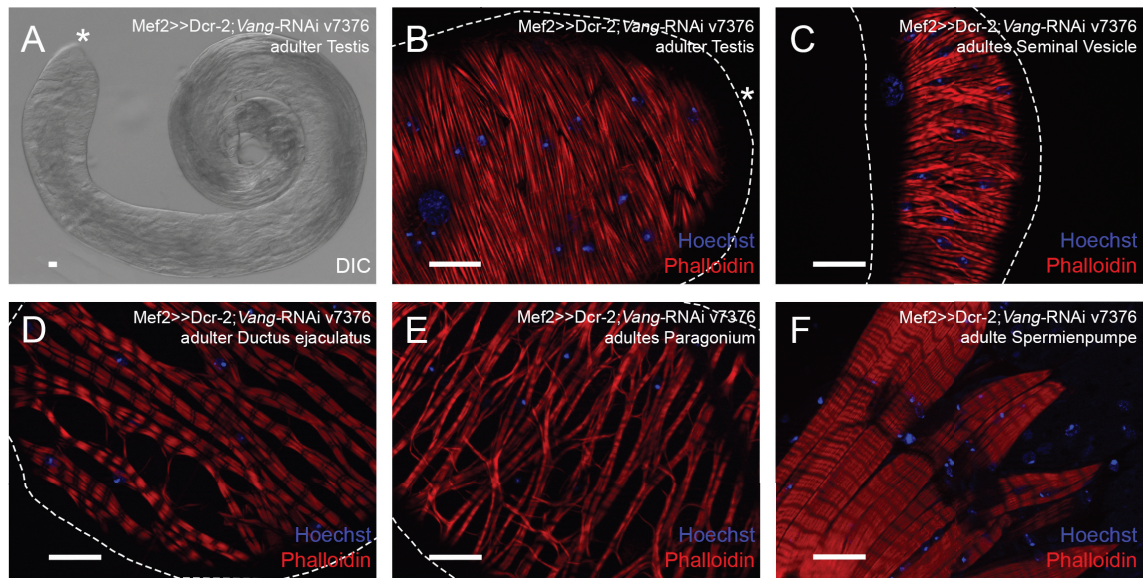
**Abbildung A20: Myoblastenspezifische Herunterregulation von *DWnt4* resultiert in starken Defekten der Reproduktionstrakt-Muskulatur.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;DWnt4-RNAi* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Testes winden sich in verschiedene Richtungen (A). Die Testismuskulatur weist misorientierte Muskeln auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles sehen wildtypisch aus (C), die Muskelschichten des Ductus ejaculatus (D) sowie der Paragonien (E) weisen ebenfalls misorientierte Muskeln auf. Die Muskeln der Spermienpumpe erscheinen schmaler als im Wildtyp (F). Das Sternchen markiert die Hubregion, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



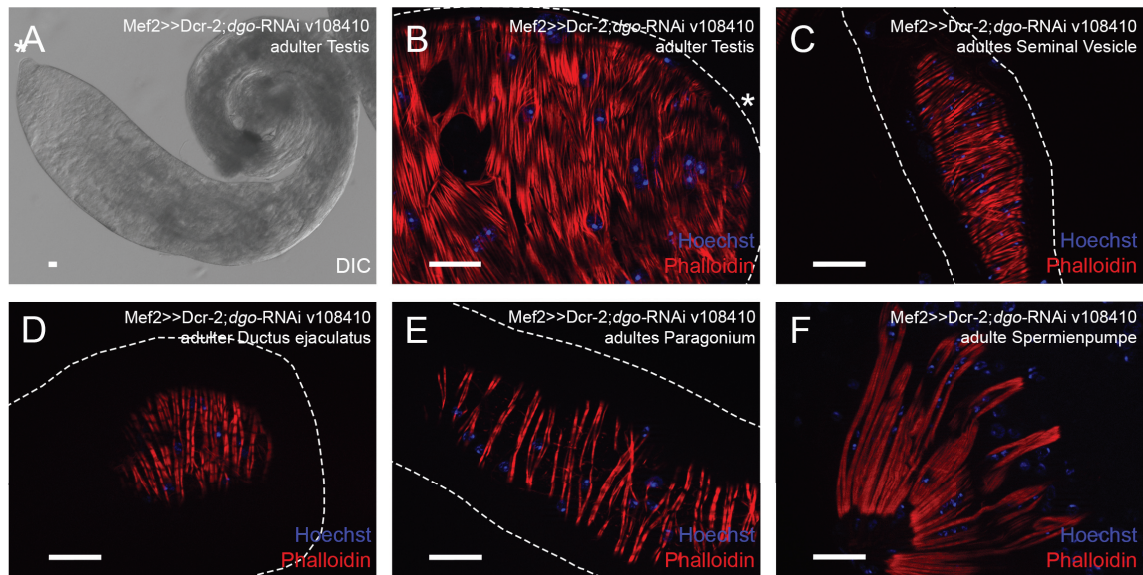
**Abbildung A21: Fertilität von Männchen nach *DWnt2*- und *DWnt4*-knock-down.** Männchen mit C855a-, Mef2- oder Mef2>>Dcr-2 getriebener *DWnt2*- bzw. *DWnt4*-RNAi verschiedener Linien wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden RNAi-Männchen aller Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Die Herunterregulation von *DWnt2* bzw. *DWnt4* durch C855a-Gal4 führt bei keiner Linie zu verminderter Fertilität, ebenso die Herunterregulation von *DWnt2* mit Mef2 oder Mef2>>Dcr-2. Die muskelspezifische Herunterregulation von *DWnt4* führt teilweise zu schwach verminderter Fertilität. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.



## 10.5 Nicht-kanonische Wnt Signalwege

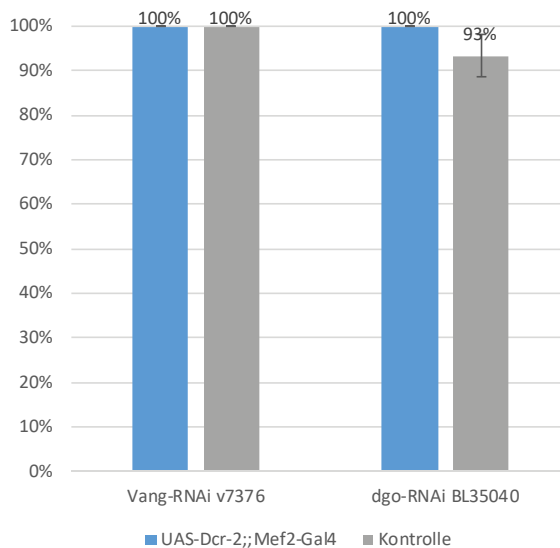


**Abbildung A22: Myoblasten- und muskelspezifischer *Van Gogh*-knock-down bewirkt leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;Vang-RNAi* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes (A) sieht ebenso wie die Testismuskulatur (B) und die Muskeln der Seminal Vesicles (C) wildtypisch aus. In der Muskulatur des Ductus ejaculatus sind einige Löcher zu erkennen (D). Die Paragonienmuskulatur (E) sowie die Muskeln der Spermiumpumpe (F) erscheinen wildtypisch. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



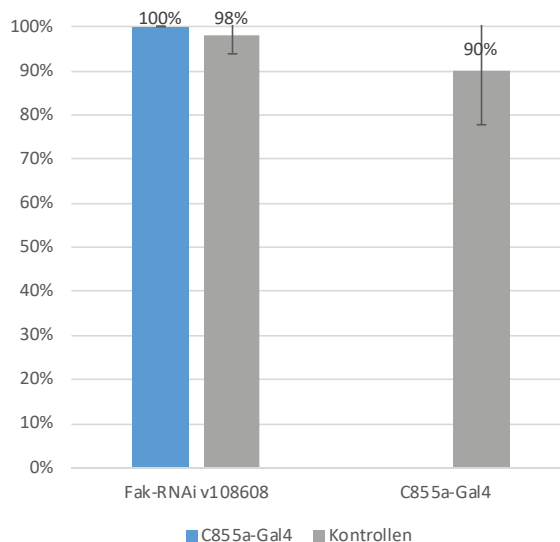
**Abbildung A23: Durch eine muskelspezifische Herunterregulation von *diego* wird die Testismuskulatur leicht gestört.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;dgo-RNAi* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes erscheint wildtypisch (A), die Muskulatur weist teilweise Löcher auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermiumpumpe (F) sehen wildtypisch aus. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.





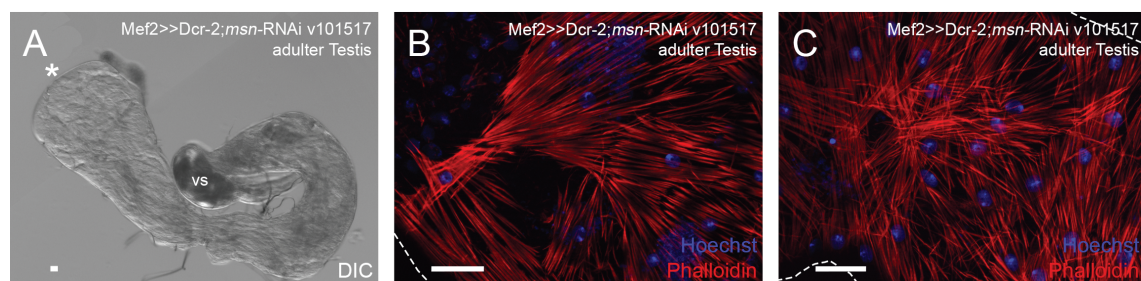
**Abbildung A24: Fertilität von Männchen nach *Van Gogh*- und *diego*-knock-down.** Männchen mit Mef2>>Dcr-2 getriebener *Vang*- bzw. *dgo*-RNAi wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden RNAi-Männchen beider Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Die Herunterregulation von *Vang* bzw. *dgo* führt nicht zu verminderter Fertilität. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.

## 10.6 Focal adhesion kinase

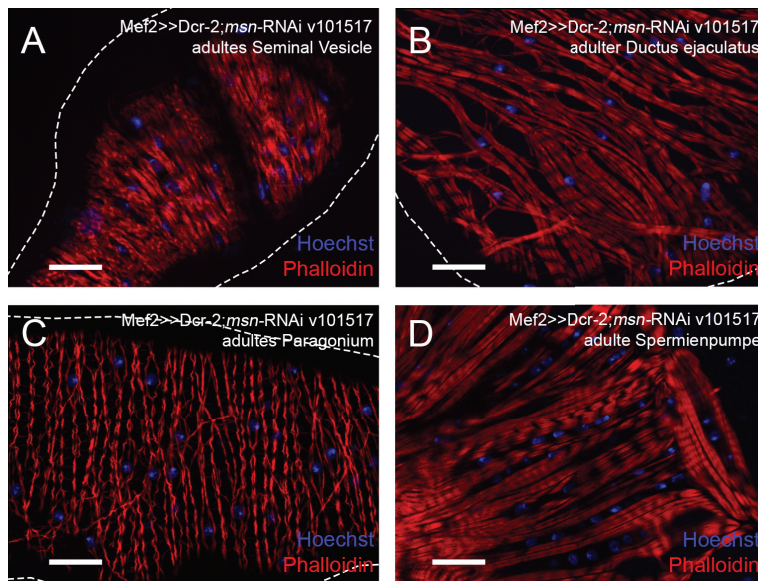


**Abbildung A25: Fertilität von Männchen nach *Fak*-knock-down.** Männchen mit C855a-getriebener *Fak*-RNAi wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden *Fak*-RNAi-Männchen sowie C855a-Gal4-Männchen unter den gleichen Bedingungen getestet. Die Herunterregulation von *Fak* in der Testishülle führt nicht zu verminderter Fertilität. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.

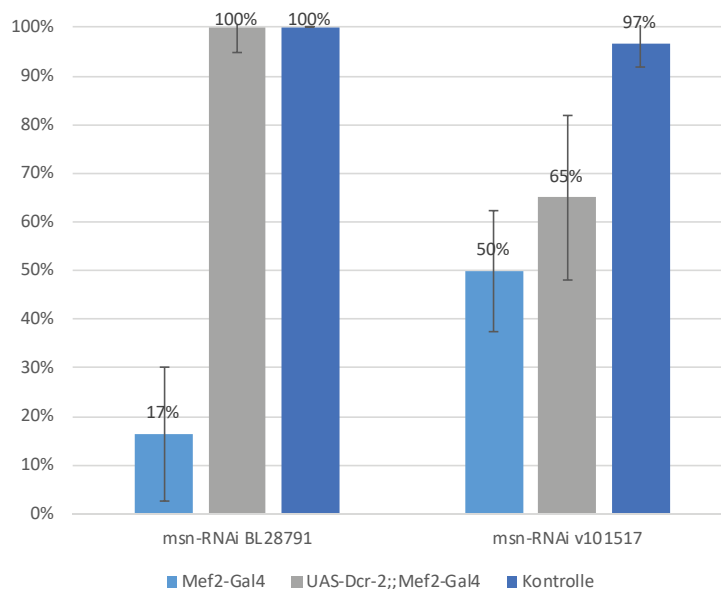
## 10.7 MAP Kinase-Weg



**Abbildung A26: Myoblasten- und muskelspezifische Herunterregulation von *misshapen* ruft starke Defekte in der Testismuskulatur hervor.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*msn*-RNAi exprimierenden Testes. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Testes sind an der Spitze stark vergrößert und nicht richtig aufgerollt (A). Die Hubregion weist große Löcher und teilweise gar keine Muskeln auf (B), die gesamte Testismuskulatur beinhaltet misorientierte Muskeln (C). Das Sternchen markiert die Hubregion, gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

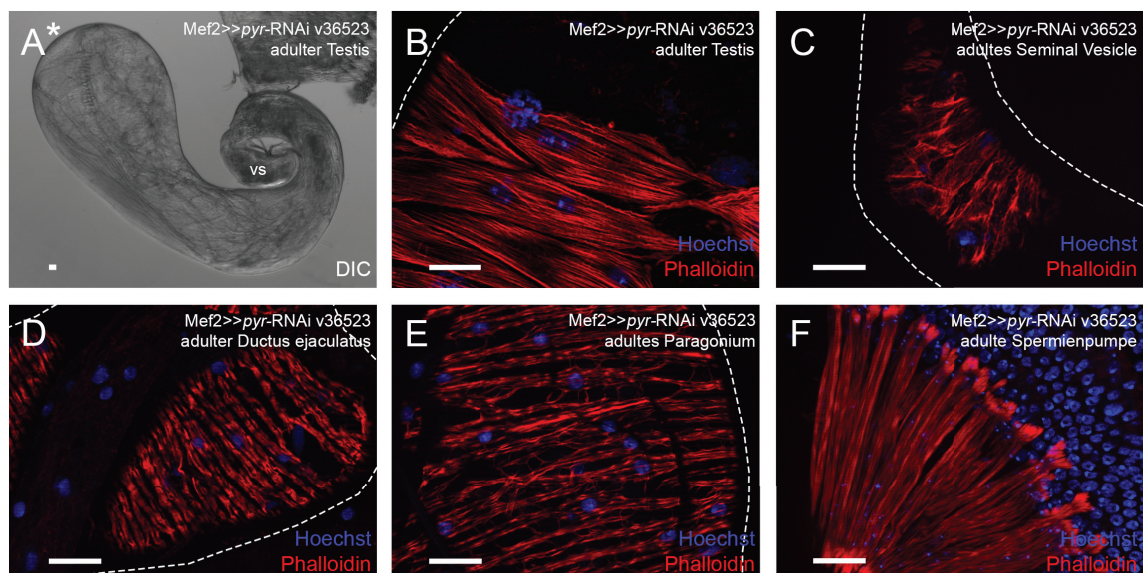


**Abbildung A27: Durch einen *misshapen*-knock-down wird die Muskulatur der Spermiumpumpe gestört.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;msn-RNAi v101517* exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Muskeln der Seminal Vesicles (A), des Ductus ejaculatus (B) sowie der Paragonien (C) erscheinen wildtypisch. In der Spermiumpumpe sind falsch angeordnete Muskeln zu sehen (D). Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



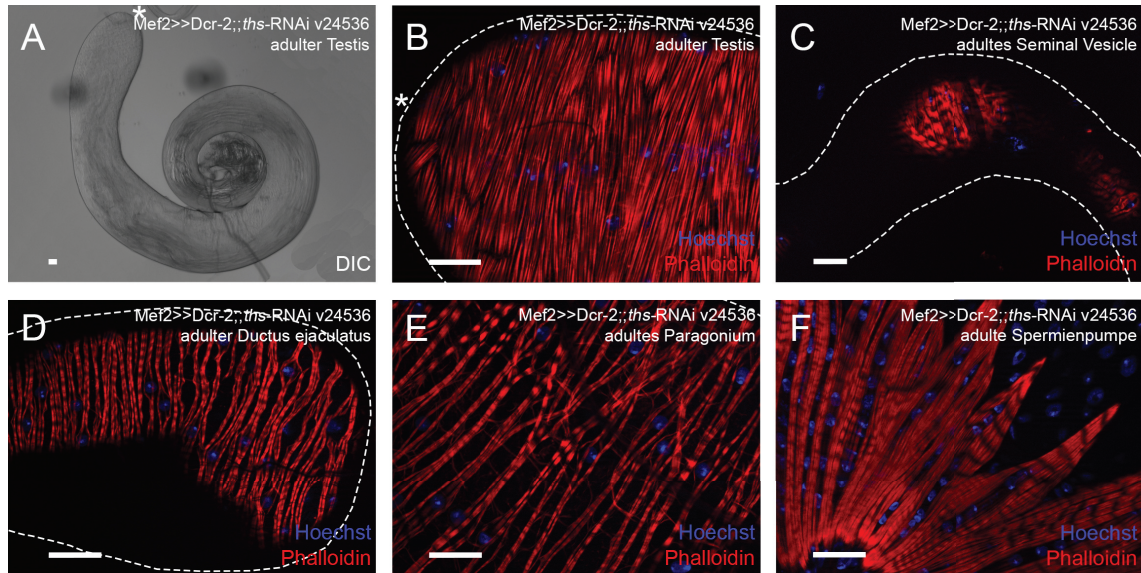
**Abbildung A28: Fertilität von Männchen nach *misshapen*-Herunterregulation.** Männchen mit *Mef2*- oder *Mef2>>Dcr-2* getriebener *msn*-RNAi zwei verschiedener Linien wurden mit drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden RNAi-Männchen beider Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Der *msn*-knock-down mit *Mef2*-Gal4 führt bei beiden Linien zu verminderter bzw. stark verminderter Fertilität. Durch *Dcr-2* wird die Fertilität nicht stärker vermindert, sondern sogar erhöht. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.

## 10.8 FGF Signalweg

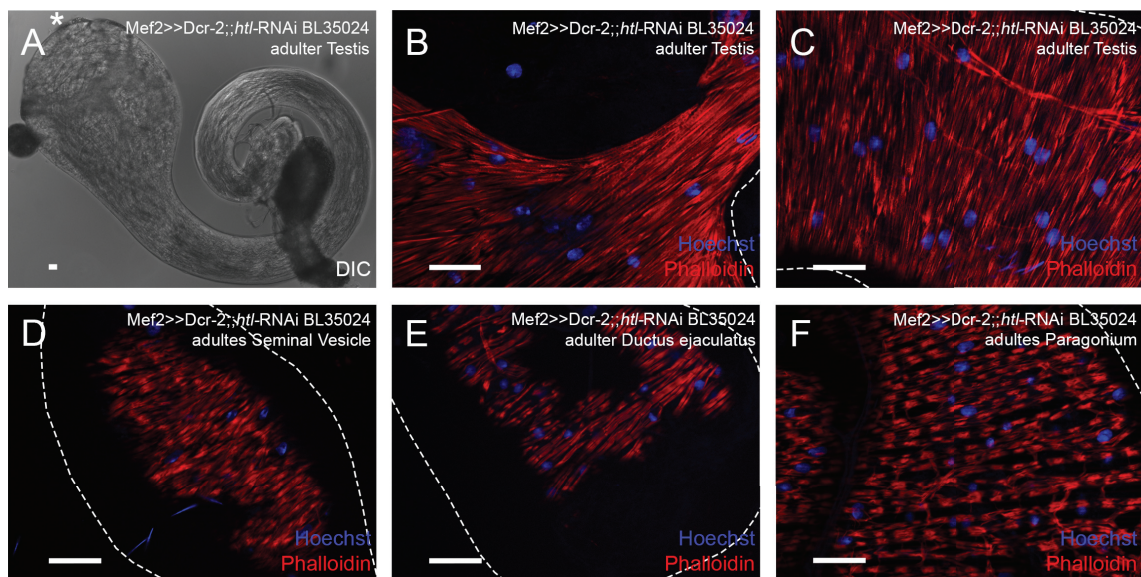




**Abbildung A29: Die myoblastenspezifische Herunterregulation von *pyramus* ruft Defekte in Testis- sowie Seminal Vesicle-Muskeln hervor.** Analyse von adulten *Mef2>>pyr-RNAi* exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Adulte Testes sind klein und verkürzt mit einer stark vergrößerten Spitze (A). Die Hubregion weist keine Muskeln auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles sind untereinander vernetzt (C). Die Muskulatur des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) erscheinen wildtypisch. vs = Seminal Vesicle. Das Sternchen markiert die Hubregion. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

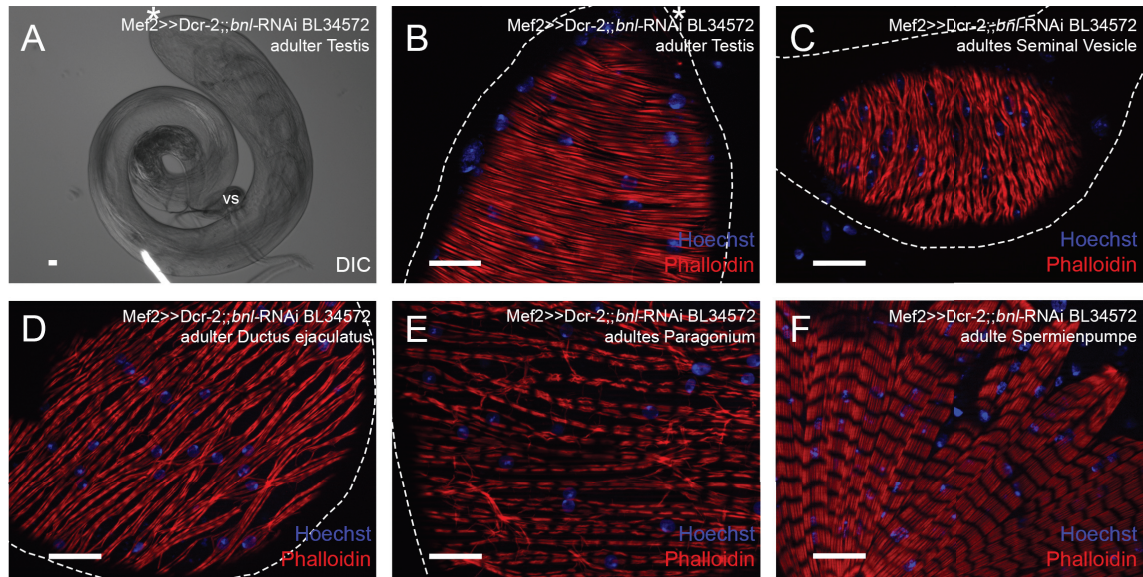


**Abbildung A30: Der *thisbe*-knock-down in Muskeln ruft keine Defekte hervor.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;;ths-RNAi* exprimierenden Reproduktionssystemen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes (A) sieht ebenso wie die Testismuskulatur (B) wildtypisch aus. Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) erscheinen wildtypisch. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

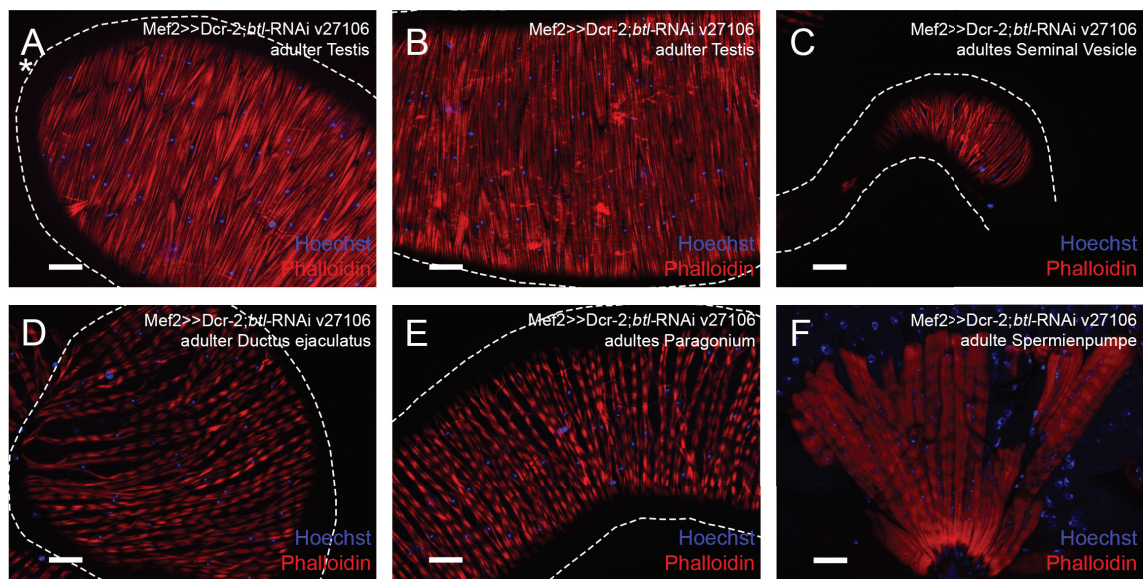


**Abbildung A31: Der muskelspezifische knock-down von *heartless* stört die Migration der Testes-Myotuben.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2;;htl-RNAi* exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Der Testis weist eine verdickte Spitze auf (A). In der Hubregion weist der Testis keine Muskeln auf (B), die restliche Testismuskulatur (C) sowie die Muskeln der Seminal Vesicles (D), des Ductus ejaculatus (E) und der Paragonien (F) sehen hingegen wildtypisch aus. Das Sternchen markiert die Hubregion. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

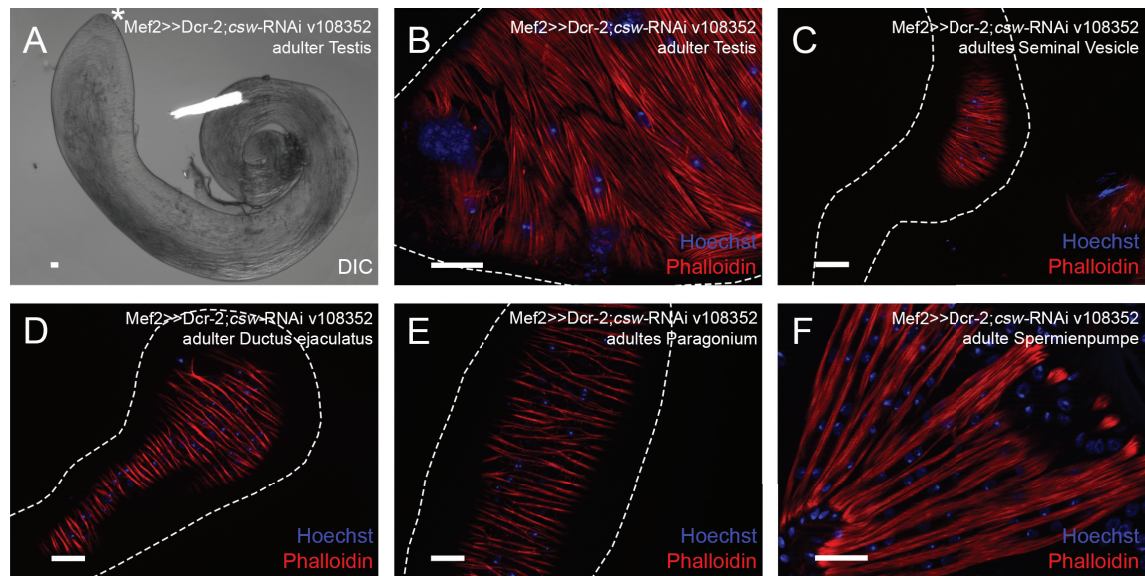




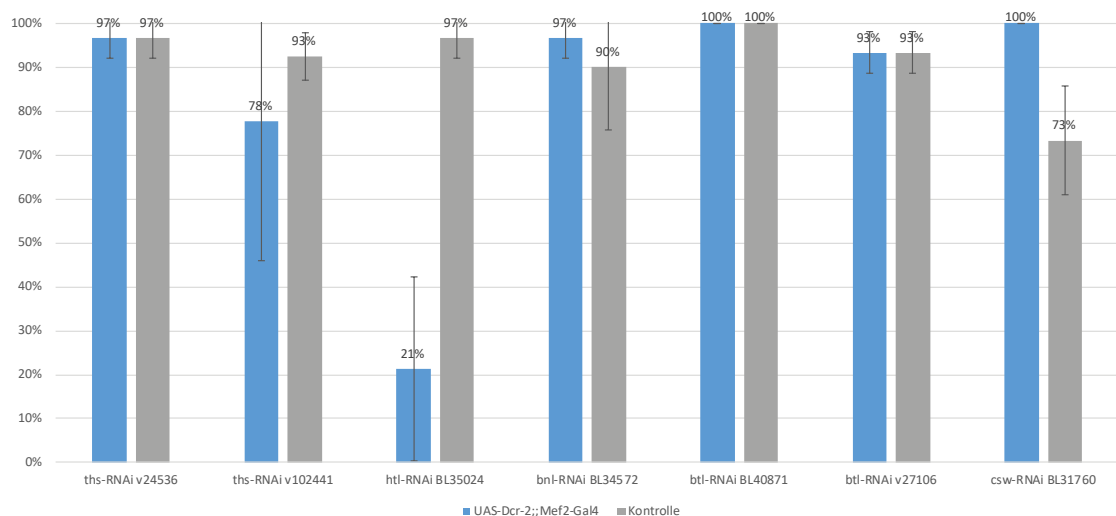
**Abbildung A32: Herunterregulation von *branchless* in Muskeln stört die Muskeln der Reproduktionsorgane nicht.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*bnl*-RNAi BL34572 exprimierenden Reproduktionsorganen. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes (A) sieht ebenso wie die Testismuskulatur (B) wildtypisch aus. Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) erscheinen wildtypisch. vs = Seminal Vesicle. Sternchen markieren die Hubregionen. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.



**Abbildung A33: Durch den muskelspezifischen *breathless*-knock-down wird die Reproduktionstrakt-Muskulatur nicht gestört.** Analyse von adulten Mef2>>Dcr-2;*btl*-RNAi v27106 exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Testismuskulatur weist weder in der Hubregion (A) noch in anderen Teilen (B) Defekte auf. Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermienpumpe (F) sehen wildtypisch aus. Das Sternchen markiert die Hubregion. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20 µm.

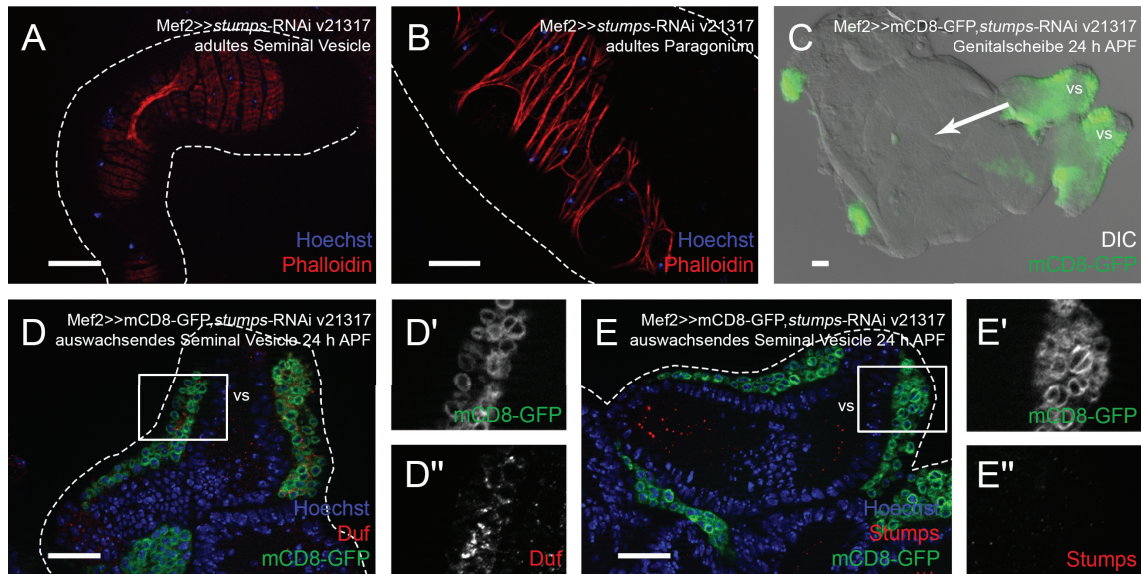


**Abbildung A34: Durch den *corkscrew*-knock-down wird die Testismuskulatur leicht gestört.** Analyse von adulten *Mef2>>Dcr-2; csw-RNAi v108352* exprimierenden Reproduktionstrakten. Phalloidin färbt F-Aktin, Hoechst markiert die Zellkerne. Die Morphologie der Testes erscheint wildtypisch (A), die Muskulatur weist in der Hubregion leichte Defekte auf (B). Die Muskeln der Seminal Vesicles (C), des Ductus ejaculatus (D), der Paragonien (E) sowie der Spermenpumpe (F) sehen wildtypisch aus. Das Sternchen markiert die Hubregion. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.



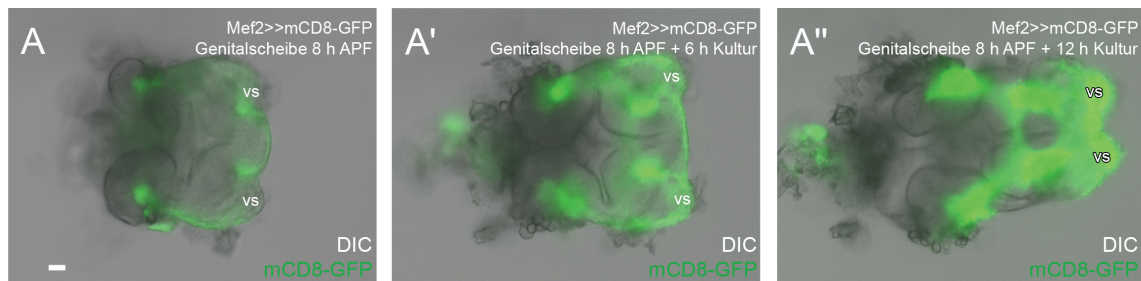
**Abbildung A35: Fertilität von Männchen nach RNAi-vermitteltem knock-down verschiedener FGF Komponenten.** Männchen mit *Mef2>>Dcr-2* getriebener RNAi verschiedener FGF Komponenten wurden jeweils drei wildtypischen Jungfrauen gekreuzt. Zur Kontrolle wurden RNAi-Männchen aller Linien unter den gleichen Bedingungen getestet. Die muskelspezifische Herunterregulation von *ths* führt bei einer Linie zu schwach verminderter Fertilität. Herunterregulationen von *htl* mit *Mef2>>Dcr-2* führt zu stark verminderter Fertilität. Durch muskelspezifische Herunterregulation von *bnl*, *btl* sowie *csw* wird die Fertilität nicht beeinträchtigt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = 30.





**Abbildung A36: Effektive *stumps*-Herunterregulation verändert nicht die Expression von Duf.** Immunfluoreszenz Analysen an *Mef2>>stumps-RNAi* exprimierenden Genitalscheiben und adulten Reproduktionsorganen. Auf Genitalscheiben sind Myoblasten durch mCD8-GFP markiert. Die Zellkerne werden durch Hoechst angefärbt, Phalloidin färbt F-Aktin in der adulten Muskulatur. Nach muskelspezifischer *stumps*-Herunterregulation weisen adulte Seminal Vesicles (A) und Paragonien (B) Defekte in der Muskulatur auf. Die Menge an Myoblasten ist im hinteren Bereich der Genitalscheibe (Pfeil) stark reduziert (C). Die Herunterregulation von *stumps* ändert die Expression von Duf in Myoblasten bei 24 h APF jedoch nicht (D-D''). Nach Herunterregulation ist Stumps nicht mehr detektierbar in Myoblasten auf auswachsenden Seminal Vesicles bei 24 h APF (E-E''). Kästen kennzeichnen vergrößerte Bereiche. Gestrichelte Linien geben die ungefähre Organform wieder. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

## 10.9 *Ex vivo* Kulturen



**Abbildung A37: Genitalscheiben entwickeln sich in *ex vivo* Co-Kulturen mit Testes weiter.** Aufnahmen aus „live imaging“ Experimenten einer *ex vivo* Co-Kultur aus Genitalscheiben und Testes 8 h APF. Die Myoblasten sind durch mCD8-GFP markiert. Die Genitalscheibe weist Testes-relevante Myoblasten auf den sich entwickelnden Seminal Vesicles (vs) auf (A). Während der zwölfstündigen Aufnahmen wachsen die Seminal Vesicles stark aus, die Myoblastenmenge auf der Genitalscheibe erhöht sich ebenfalls in erheblichem Maße (A'-A''). Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

**11. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Überblick der „border cell“ Migration in Ovarien von <i>Drosophila</i> .	4
Abbildung 2	Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane während der Metamorphose.	6
Abbildung 3	Testes-relevante Myoblasten können in zwei Arten unterteilt werden und fusionieren.	8
Abbildung 4	Überblick der Migration naszierender Testes-Myotuben in <i>Drosophila</i> .	9
Abbildung 5	Überblick des kanonischen Wnt Signalweges in <i>Drosophila</i> .	11
Abbildung 6	Überblick des PCP Kernmoduls in <i>Drosophila</i> .	14
Abbildung 7	Überblick des EGFR-aktivierten MAPK Signalweges in <i>Drosophila</i> .	15
Abbildung 8	Schematischer Überblick des FGF Signalweges in <i>Drosophila</i> .	19
Abbildung 9	<i>frizzled2</i> -GFP ist teilweise in Zellkernen von Testes-Myotuben aktiv.	24
Abbildung 10	Transkripte von <i>frizzled2</i> lokalisieren in Myoblasten über den Seminal Vesicles und im terminalen Epithel von pupalen Testes.	27
Abbildung 11	Transkripte der Wnt-Zielgene <i>nemo</i> und <i>naked cuticle</i> sind in naszierenden Testes-Myotuben detektierbar.	28
Abbildung 12	Frizzled2, Armadillo und der transkriptionelle Co-Repressor Groucho sind in naszierenden Myotuben detektierbar.	30
Abbildung 13	Die muskelspezifische Herunterregulation von <i>armadillo</i> stört die Adhäsion zwischen benachbarten Testismuskeln und die Formgebung der Testes.	34
Abbildung 14	Der muskelspezifische knock-down von <i>pangolin</i> oder <i>frizzled2</i> beeinflusst nicht die Expression von Duf.	36
Abbildung 15	Die Herunterregulation von <i>DWnt2</i> in der Testishülle bewirkt leichte Defekte in der Testismuskulatur.	39
Abbildung 16	<i>DWnt2</i> ist eine Komponente in der Determination der Testismuskeln.	41
Abbildung 17	<i>Starry night</i> ist in Testes-relevanten Myoblasten detektierbar.	43
Abbildung 18	Die Herunterregulation von <i>prickle</i> in Muskeln ruft Defekte in der Testismuskulatur hervor.	44
Abbildung 19	Transkripte von <i>Fak</i> lassen sich in naszierenden Testes-Myotuben detektieren.	46
Abbildung 20	Der knock-down von <i>Fak</i> in der Testishülle führt nicht zu Defekten.	46
Abbildung 21	Aktivierte MAPK Erk ist in Testes-relevanten Myoblasten und naszierenden Myotuben nachweisbar.	48
Abbildung 22	Muskelspezifischer knock-down von <i>misshapen</i> resultiert in starken	

	Defekten der Testismuskulatur.	50
Abbildung 23	Der muskelspezifische <i>misshapen</i> -knock-down verändert die Expression von Cadherin-N.	51
Abbildung 24	Stumps und aktivierte MAPK Erk co-lokalisieren in naszierenden Testes-Myotuben.	52
Abbildung 25	Muskelspezifische Herunterregulation von <i>heartless</i> stört die Entwicklung der Testismuskeln.	55
Abbildung 26	RNAi-vermittelter <i>stumps</i> -knock-down behindert die Migration der Testes-Myotuben.	56
Abbildung 27	Genitalscheiben entwickeln sich <i>ex vivo</i> weiter.	58
Abbildung 28	Stumps beeinflusst die Migration der Testes-Myotuben.	59
Abbildung 29	Die Migration der naszierenden Myotuben kann in zwei Phasen unterteilt werden, die vom Heartless-abhängigen FGF Signalweg gesteuert werden.	78
Abbildung A1	<i>frizzled3</i> -GFP ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung aktiv.	123
Abbildung A2	Zwei Shaggy::GFP Linien zeigen unterschiedliche Expressionsmuster.	124
Abbildung A3	<i>nemo</i> -GFP ist in verschiedenen Epithelien von Genitalscheiben aktiv.	124
Abbildung A4	Trol::GFP markiert die Muskeln des männlichen Reproduktionstraktes.	124
Abbildung A5	Viking::GFP markiert die Muskeln der männlichen Reproduktionsorgane.	125
Abbildung A6	C564-Gal4 treibt die Expression in sekretorischen Zellen des Paragoniums.	126
Abbildung A7	Frizzled2-Gal4 treibt teilweise in Myotuben auf pupalen Testes.	127
Abbildung A8	H94-Gal4 treibt die Expression in sekretorischen Zellen des Paragoniums.	127
Abbildung A9	Transkripte von <i>armadillo</i> sind in naszierenden Testes-Myotuben detektierbar.	128
Abbildung A10	Beide <i>arrow</i> -Sonden zeigen Signale in Keimzellen.	128
Abbildung A11	Muskelspezifische <i>frizzled2</i> -Herunterregulation in Kombination mit Dicer-2 führt zu leichten Defekten in der Testismuskulatur.	129
Abbildung A12	RNAi-vermittelter knock-down von <i>arrow</i> in Muskeln ruft leichte Defekte in der Paragonienmuskulatur hervor.	129
Abbildung A13	Herunterregulation von <i>APC-like</i> in Muskeln bewirkt leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus.	130
Abbildung A14	Muskelspezifischer <i>shaggy</i> -knock-down stört die Migration der Testes-Myotuben.	130
Abbildung A15	Durch den muskelspezifischen <i>pangolin</i> -knock-down wird die Testis-	

	<b>muskulatur leicht gestört.</b>	131
Abbildung A16	Fertilität von Männchen nach <i>frizzled2</i> -knock-down.	131
Abbildung A17	Fertilität von Männchen nach RNAi-vermittelter Herunterregulation verschiedener Wnt Komponenten.	132
Abbildung A18	Die RNAi-Linie v44391 führt nicht zu einer sichtbaren Herunterregulation von <i>frizzled2</i> .	132
Abbildung A19	RNAi-vermittelter knock-down von <i>DWnt2</i> in Myoblasten ruft leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus hervor.	132
Abbildung A20	Myoblastenspezifische Herunterregulation von <i>DWnt4</i> resultiert in starken Defekten der Reproduktionstrakt-Muskulatur.	133
Abbildung A21	Fertilität von Männchen nach <i>DWnt2</i> - und <i>DWnt4</i> -knock-down.	133
Abbildung A22	Myoblasten- und muskelspezifischer <i>Van Gogh</i> -knock-down bewirkt leichte Defekte in der Muskulatur des Ductus ejaculatus.	134
Abbildung A23	Durch eine muskelspezifische Herunterregulation von <i>diego</i> wird die Testismuskulatur leicht gestört.	134
Abbildung A24	Fertilität von Männchen nach <i>Van Gogh</i> - und <i>diego</i> -knock-down.	135
Abbildung A25	Fertilität von Männchen nach <i>Fak</i> -knock-down.	135
Abbildung A26	Myoblasten- und muskelspezifische Herunterregulation von <i>misshapen</i> ruft starke Defekte in der Testismuskulatur hervor.	135
Abbildung A27	Durch einen <i>misshapen</i> -knock-down wird die Muskulatur der Spermienpumpe gestört.	136
Abbildung A28	Fertilität von Männchen nach <i>misshapen</i> -Herunterregulation.	136
Abbildung A29	Die myoblastenspezifische Herunterregulation von <i>pyramus</i> ruft Defekte in Testis- sowie Seminal Vesicle-Muskeln hervor.	137
Abbildung A30	Der <i>thisbe</i> -knock-down in Muskeln ruft keine Defekte hervor.	137
Abbildung A31	Der muskelspezifische knock-down von <i>heartless</i> stört die Migration der Testes-Myotuben.	137
Abbildung A32	Herunterregulation von <i>branchless</i> in Muskeln stört die Muskeln der Reproduktionsorgane nicht.	138
Abbildung A33	Durch den muskelspezifischen <i>breathless</i> -knock-down wird die Reproduktionstrakt-Muskulatur nicht gestört.	138
Abbildung A34	Durch den <i>corkscrew</i> -knock-down wird die Testismuskulatur leicht gestört.	139
Abbildung A35	Fertilität von Männchen nach RNAi-vermitteltem knock-down verschiedener FGF Komponenten.	139
Abbildung A36	Effektive <i>stumps</i> -Herunterregulation verändert nicht die Expression von Duf.	140
Abbildung A37	Genitalscheiben entwickeln sich in <i>ex vivo</i> Co-Kulturen mit Testes weiter.	140

**12. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b>	Übersicht der RT-PCRs von Komponenten des kanonischen Wnt Signalweges	26
<b>Tabelle 2</b>	Übersicht der RT-PCRs von Zielgenen des kanonischen Wnt Signalweges	28
<b>Tabelle 3</b>	Übersicht RNAi-vermittelter knock-downs kanonischer Wnt Komponenten	31
<b>Tabelle 4</b>	Ergebnisse der Kernzahlbestimmungen verschiedener kanonischer Wnt Komponenten	35
<b>Tabelle 5</b>	Übersicht der RT-PCRs der Wnt Liganden	37
<b>Tabelle 6</b>	Übersicht der RNAi-vermittelten Herunterregulation von <i>DWnt2</i> und <i>DWnt4</i>	38
<b>Tabelle 7</b>	Phänotypen verschiedener <i>DWnt2</i> - und <i>DWnt4</i> -Allele	40
<b>Tabelle 8</b>	Übersicht der RT-PCRs für das globale PCP Modul	42
<b>Tabelle 9</b>	Tabelle 9: Übersicht der RT-PCRs für das PCP Kernmodul	42
<b>Tabelle 10</b>	Übersicht muskelspezifischer knock-downs von PCP Kernmodul-Komponenten	43
<b>Tabelle 11</b>	Übersicht der RT-PCRs von <i>Fak</i>	45
<b>Tabelle 12</b>	Übersicht der RT-PCRs von <i>msn</i>	48
<b>Tabelle 13</b>	Übersicht der RNAi-vermittelten Herunterregulation von <i>msn</i>	49
<b>Tabelle 14</b>	Übersicht RNAi-vermittelter Herunterregulationen einiger FGF Komponenten	53
<b>Tabelle 15</b>	Ergebnisse der Kernzahlbestimmungen verschiedener FGF Komponenten	57
<b>Tabelle A1</b>	Ergebnisse des GFP-Trap Screens	121
<b>Tabelle A2</b>	Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Gal4-Treiber	125



**13. Erklärung**

Erklärung gem. §5 der Promotionsordnung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Charakterisierung von Wnt, MAPK und FGF Signalwegen während der Migration naszierender Myotuben auf die Testes von *Drosophila***

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 08.12.2016

(Silke Fender)